



Université de Sherbrooke

**Rôle de la protéine LRP6 dans l'action oncogénique de la  
voie KRAS/BRAF/MEK/ERK dans les cellules cancéreuses colorectales**

Par  
Anthony Côté-Biron  
Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juillet 2020

Membres du jury d'évaluation

Pre Nathalie Rivard, programme de Biologie Cellulaire  
Pr Steve Jean, programme de Biologie Cellulaire  
Pr Simon Labbé, programme de Biochimie

© Anthony Côté-Biron, 2020

## Résumé

### Rôle de la protéine LRP6 dans l'action oncogénique de la voie KRAS/BRAF/MEK/ERK dans les cellules cancéreuses colorectales

Par

Anthony Côté-Biron

Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le récepteur transmembranaire LRP6 est connu pour régulariser la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, une voie très conservée dans l'évolution connue pour contrôler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules souches. Dans la majorité des cancers colorectaux, cette voie est constitutivement active en raison de mutations de type perte de fonction dans le gène suppresseur de tumeur *APC*. Il est connu que l'expression de LRP6 et sa phosphorylation (témoignant de son état d'activation) sont augmentées dans les tumeurs colorectales des patients comparativement aux tissus sains. Notre équipe de recherche a récemment démontré que la transformation de cellules épithéliales intestinales normales par des formes oncogéniques de *KRAS* ou *BRAF*, deux gènes fréquemment mutés dans le cancer colorectal, était associée à une hausse de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine et ce, de manière dépendante de l'activité des MAP Kinases, les effecteurs des protéines *KRAS* et *BRAF*. De plus, une augmentation des phosphorylations activatrices de LRP6 sur sérine 1490 et thréonine 1572 a été observée dans ces mêmes cellules. Ces résultats suggéraient donc que la phosphorylation de LRP6 contribue au signal oncogénique induit par la voie *KRAS/BRAF/MEK/ERK* dans les cellules épithéliales intestinales et donc, dans le développement du cancer colorectal. Durant mes travaux de maîtrise, j'ai utilisé un inhibiteur pharmacologique des kinases ERK1/2, ou une forme recombinante de l'EGF pour analyser la modulation de la phosphorylation de LRP6 par l'activité des MAP Kinases. J'ai également inhibé par interférence d'ARN l'expression de LRP6 dans quelques lignées cancéreuses colorectales humaines (HCT116, HT-29 et SW-48) à l'aide de lentivirus. Mes résultats ont permis de démontrer que la phosphorylation de LRP6 était bien dépendante de l'activation des kinases ERK1/2 dans des cellules cancéreuses portant des mutations activatrices pour *KRAS* ou *BRAF* (HCT116 et HT-29). Cependant, la diminution de l'expression de LRP6 dans les différentes lignées cancéreuses n'a pas affecté significativement leur métabolisme, leur capacité à croître en indépendance d'ancrage et leur survie clonogénique et ce, peu importe le statut mutationnel des gènes *KRAS* ou *BRAF*. En résumé, ces résultats démontrent que même si la phosphorylation de LRP6 est bel et bien augmentée dépendamment de l'activation de la voie des MAP Kinases dans les cellules mutées pour *KRAS* ou *BRAF*, la baisse de son expression n'est pas suffisante pour altérer leurs propriétés tumorales.

Mots clés : LRP6, phosphorylation, signalisation cellulaire, cancer colorectal, cellules épithéliales intestinales,  $\beta$ -caténine

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des schémas .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations.....	viii
<b>1. Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Le système digestif et le processus de digestion</b> .....	1
<b>1.2 L'épithélium intestinal</b> .....	2
1.2.1 L'épithélium de l'intestin grêle.....	2
1.2.2 L'épithélium du côlon .....	4
1.2.3 Les cellules épithéliales intestinales .....	4
<b>1.3 Les voies de signalisation importantes pour la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales</b> .....	8
1.3.1 La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.....	8
1.3.1.1 Description de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine .....	8
1.3.1.1.1 Rôle central du co-récepteur LRP6 dans l'activation de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine .....	11
1.3.1.2 Importance de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches.....	12
1.3.2 La Signalisation de Notch .....	13
1.3.2.1 Description de la signalisation Notch.....	13
1.3.2.2 Importance de cette voie dans le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches.....	14
1.3.3 La signalisation des BMP.....	15
1.3.3.1 Description de la signalisation des BMP .....	15
1.3.3.2 Importance de cette voie dans le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches.....	15
1.3.4 La signalisation EGFR/MAPK .....	16
1.3.4.1 Description de la signalisation EGFR/MAPK.....	16
1.3.4.2 Importance de cette voie dans le maintien et la prolifération des cellules souches et progénitrices .....	18
<b>1.4 Le cancer colorectal</b> .....	19

1.4.1 Généralités .....	19
1.4.2 Principaux mécanismes de carcinogenèse colorectale sporadique .....	19
1.4.2.1- L'instabilité chromosomique (CIN) .....	21
1.4.2.2 - L'instabilité des microsatellites (MSI) .....	21
1.4.2.3 - La méthylation des îlots CpG (CIMP).....	22
1.4.3 Dérégulation des voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et RAS/MAPK .....	22
1.4.3.1 Mutations inactivatrices (« perte de fonction ») dans le gène suppresseur de tumeur APC.....	22
1.4.3.2 Mutations activatrices (« gain de fonction ») dans les oncogènes KRAS et BRAF....	23
1.4.3.3 LRP6 : une protéine au carrefour des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et RAS/MAPK24	
2. Hypothèse et objectifs .....	26
3. Matériel et méthodes .....	27
<b>3.1 Matériel</b> .....	27
3.1.1 Anticorps.....	27
3.1.2 Inhibiteurs et molécules .....	27
<b>3.2 Méthodes</b> .....	28
3.2.1 Culture cellulaire .....	28
3.2.1.1 Lignées cellulaires utilisées .....	28
3.2.1.2 Production de lentivirus.....	29
3.2.1.3 Infection virale des cellules colorectales cancéreuses .....	29
3.2.1.4 Traitements pharmacologiques et stimulations.....	30
3.2.1.5 Transfection de siARN .....	30
3.2.1.6 Lyse cellulaire .....	31
3.2.2 Immunobuvardage .....	31
3.2.3 Génération des constructions Tet-pLKO-puro shLRP6 .....	32
3.2.4 Induction de l'expression des shARN inducibles.....	32
3.2.5 Essais cellulaires .....	32
3.2.5.1 Croissance en indépendance d'ancrage.....	33
3.2.5.2 Essais clonogéniques.....	33
3.2.5.3 Incorporation de MTT .....	34
<b>3.3 Analyses statistiques</b> .....	34
4. Résultats .....	35

<b>4.1 La phosphorylation de LRP6 est dépendante de la signalisation RAS/RAF/MEK/ERK dans des cellules cancéreuses colorectales portant des mutations activatrices pour <i>KRAS</i> ou <i>BRAF</i>.</b>	<b>35</b>
<b>4.2 L'expression de LRP6 semble être nécessaire pour la croissance des cellules cancéreuses colorectales humaines HCT116.</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Validation d'un système de baisse d'expression inducible de LRP6</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Impact de la baisse d'expression de LRP6 sur l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules cancéreuses HCT116.</b>	<b>43</b>
<b>4.5 La baisse d'expression de LRP6 n'a pas d'impact significatif sur l'activité métabolique des cellules cancéreuses colorectales.</b>	<b>44</b>
<b>4.6 La baisse d'expression de LRP6 n'a pas d'impact significatif sur la capacité de croissance en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales.</b>	<b>46</b>
<b>4.7 La baisse d'expression de LRP6 n'a pas d'impact significatif sur la survie clonogénique des cellules cancéreuses colorectales.</b>	<b>48</b>
<b>5. Discussion</b>	<b>50</b>
<b>5.1 La phosphorylation de LRP6 est différenciellement régulée dans les lignées cancéreuses colorectales portant des mutations activatrices pour <i>KRAS</i> ou <i>BRAF</i>.</b>	<b>50</b>
<b>5.2 La baisse d'expression du co-récepteur LRP6 a peu d'impact sur métabolisme, la croissance en indépendance d'ancrage et la survie clonogénique des cellules cancéreuses colorectales humaines, même celles mutées pour <i>KRAS</i> ou <i>BRAF</i>.</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Pourquoi la baisse d'expression de LRP6 n'altère pas les propriétés tumorales de cellules cancéreuses colorectales humaines?</b>	<b>56</b>
<b>5.4 LRP6 : une cible quand même intéressante pour le traitement du cancer colorectal ?</b>	<b>59</b>
<b>6. Conclusion et perspectives</b>	<b>61</b>
<b>7. Remerciements</b>	<b>63</b>
<b>8. Liste des références</b>	<b>64</b>

## Liste des schémas

<b>Schéma 1:</b> Structure de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle .....	3
<b>Schéma 2:</b> Structure de l'axe cryptal colonique .....	5
<b>Schéma 3:</b> Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine .....	10
<b>Schéma 4:</b> Structure de la protéine transmembranaire LRP6 .....	12
<b>Schéma 5:</b> Voie de signalisation Notch.....	14
<b>Schéma 6:</b> Voie de signalisation des BMP.....	16
<b>Schéma 7:</b> Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK.....	18
<b>Schéma 8:</b> Voies moléculaires menant au développement du cancer colorectal .....	20

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> L'inhibition pharmacologique de ERK1/2 par le SCH772984 diminue la phosphorylation de LRP6 chez les cellules cancéreuses colorectales portant des mutations activatrices pour <i>KRAS</i> ou <i>BRAF</i> .....	36
<b>Figure 2:</b> L'inhibition pharmacologique de ERK1/2 par le SCH772984 affecte peu la phosphorylation de LRP6 des cellules cancéreuses sauvages pour <i>KRAS</i> ou <i>BRAF</i> .....	37
<b>Figure 3:</b> L'EGF stimule la phosphorylation rapide de LRP6 dans des cellules cancéreuses colorectales humaines. ....	38
<b>Figure 4:</b> La baisse d'expression de LRP6 diminue fortement la capacité des cellules HCT116 à croître en indépendance d'ancrage.....	40
<b>Figure 5:</b> Évaluation de l'efficacité des ARN interférants dirigés contre l'ARN messager de LRP6. ....	41
<b>Figure 6:</b> Validation d'un modèle d'expression stable de shARN inductibles dirigés contre LRP6. ....	42
<b>Figure 7:</b> Impact de la baisse d'expression de LRP6 sur certains marqueurs du cycle cellulaire....	44
<b>Figure 8:</b> La baisse d'expression de LRP6 n'influence pas l'activité métabolique des cellules cancéreuses colorectales.....	45
<b>Figure 9:</b> La baisse d'expression de LRP6 n'influence pas la capacité à croître en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales. ....	47
<b>Figure 10:</b> La baisse d'expression de LRP6 n'influence pas la survie clonogénique de cellules colorectales cancéreuses.....	48



## Liste des abréviations

ADAM10 :	A Desintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10
APC :	Adenomatous Polyposis Coli
ATOH1 :	ATOnal Homolog 1
AXIN2 :	Axis Inhibition Protein 2
BMP :	Bone Morphogenetic Protein
BMPR1-2 :	Bone Morphogenetic Protein Receptor 1-2
CDK :	Cyclin-Dependant Kinase
CEI :	Cellule Epithéliale Intestinale
CIMP :	CpG Island Methylator Phenotype
CIN :	Chromosomal Instability
CK1 :	Casein Kinase 1
CRC :	Cancer colorectal
Cellules CRC :	Cellules cancéreuses colorectales
DAG :	DiAcylGlycérol
DKK1 :	DicKKopf-related protein 1
DLL4 :	Delta-Like Ligand 4
DMSO :	DiMethyl SulfOxide
Dox :	DOXycycline
DVL :	DisheVeLled
ECL :	Enhanced ChemiLuminescence
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
eIF-4E :	Eukaryotic translation Initiation Factor 4E
EphB2 :	Ephrin type-B receptor 2
EphB3 :	Ephrin type-B receptor 3
ERK1/2 :	Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2
FBS :	Fetal Bovine Serum
Fz :	Frizzled
GAP :	GTPase-Activating Protein
GDP :	Guanosine DiPhosphate
GEF :	Guanine nucleotide Exchange Factor
GSK3 :	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP :	Guanosine TriPhosphate
HCL :	Acide Chlorhydrique
HEPES :	4-(2-HydroxyEthyl) -1-PiperazineEthaneSulfanic acid
HES1 :	Hes family BHLH transcription factor 1
HRP :	HorseRadish Peroxidase
IL-13 :	InterLeukin 13
IL-25 :	InterLeukin 25
ILC2 :	type 2 Innate Lymphoid Cell
IP <sub>3</sub> :	Inositol-1,4,5-trisPhosphate
JAG1/2 :	JAGged 1/2
JAK :	Janus Kinase

JNK :	Jun N-terminal Kinases
LEF :	Lymphoid Enhancer Factor-1
LGR5 :	Leucine rich repeat containing G protein-coupled Receptor 5
LRP5/6 :	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK1/2 :	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2
MLH1 :	MutL Homolog1
MMR :	MisMatch Repair
MNK1/2 :	MAPK-interacting Kinase 1/2
MSH2/6 :	MutS Homolog 2/6
MSI :	Microsatellite Instability
MTT :	Bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium
MYC :	MYC proto-oncogene, BHLH transcription factor
NICD :	Notch IntraCellular Domain
NT :	Non-traité
NRH1 :	Neurotrophin Receptor Homolog 1
PAF :	Polypose Adénomateuse Familiale
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCP :	Planar Cell Polarity
PI3K :	Phosphoinositide-3-kinase
PIP <sub>2</sub> :	PhosphatidylInositol-4,5-bisPhosphate
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
PLC :	PhosphoLipase C
pRB :	Protéine du RétinoBlastome
PTH :	ParaThyroid Hormone
PTH1R :	ParaThyroid Hormone 1 rReceptor
PTK7 :	Protein Tyrosine Kinase 7
RAF :	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RBPJ :	Recombining Binding Protein suppressor of hairless
RCPG :	Récepteurs Couplés aux Protéines G
ROCK :	RhO-associated Protein Kinase
ROR2 :	Receptor tyrosine kinase like Orphan Receptor 2
RSK :	Ribosomal S6 Kinase
RYK :	Receptor like tYrosine Kinase
SDS :	DoDécylSulfate de sodium
SDS-PAGE :	Sodium DoDécylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SOS :	Son of Sevenless
SOX9 :	SRY (sex determining region Y)-box9
STAT :	Signal Transducer and Activators of Transcription
TCF :	T-Cell Factor
TEM :	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
TGF :	Transforming Growth Factor
TFF3 :	Trefoil Factor 3
TrCP :	Transducin repeats-Containing Protein
Wnt :	Wingless-int

# 1. Introduction

## 1.1 Le système digestif et le processus de digestion

La digestion est un mode de transformation chimique et mécanique des aliments en nutriments pouvant être assimilés par le corps humain. Elle s'effectue par l'intermédiaire du système digestif qui assure leur absorption dans le sang. Les organes qui composent le système digestif sont classés en deux groupes distincts : (1) ceux faisant partie intrinsèque du tractus gastro-intestinal et (2) les organes digestifs accessoires. Les organes du tractus gastro-intestinal sont la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Le second groupe est composé de la langue, des dents, de la vésicule biliaire, des glandes salivaires, du foie et du pancréas. Les parois du tractus gastro-intestinal sont toutes composées, à quelques différences près, des quatre mêmes couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et de la séreuse (Marieb et Hoen, 2012).

La muqueuse est la couche qui est directement en contact avec le bol alimentaire. Elle a pour fonctions la sécrétion de mucus, d'enzymes digestives et d'hormones, l'absorption des nutriments dans le sang et la protection contre les maladies infectieuses. Elle est elle-même séparée en trois parties : l'épithélium, qui est la couche donnant sur la lumière du tube digestif, la lamina propria, qui est formée de tissus conjonctifs regroupant plusieurs réseaux de capillaires et des follicules lymphoïdes, et la lamina muscularis mucosae qui est une fine couche de cellules musculaires lisses qui, dans l'intestin grêle, est la cause des repliements de la muqueuse, augmentant grandement l'aire de sa surface. La sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif très vascularisé et innervé pour subvenir aux besoins des tissus du tractus gastro-intestinal. Elle contient aussi plusieurs vaisseaux lymphatiques et follicules lymphoïdes. Son élasticité permet à l'estomac de reprendre sa taille après les repas. La musculuse quant à elle est faite de cellules musculaires lisses et est responsable du péristaltisme et des mouvements de segmentation du bol alimentaire. Finalement, la séreuse, qui porte le nom d'adventice dans le cas de l'œsophage, est la dernière couche et a pour fonctions le maintien structurel et la séparation des organes (Marieb et Hoen, 2012).

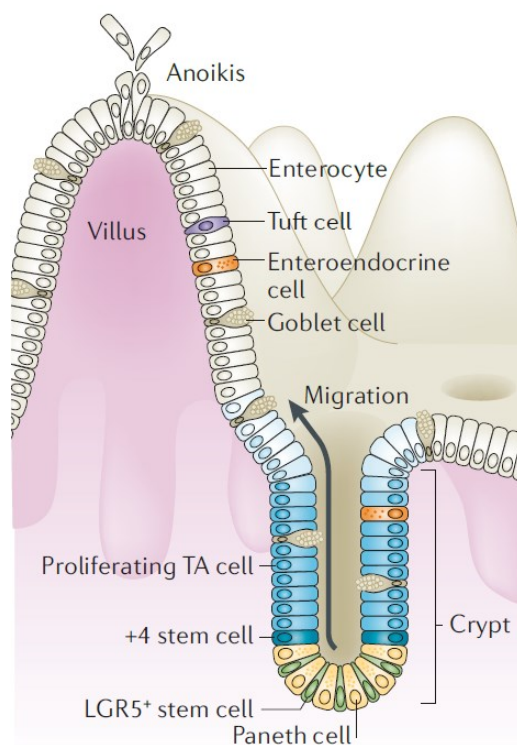
Dans le processus de digestion, les aliments sont ingérés par la bouche, mastiqués et mélangés avec la salive qui contient des enzymes digestives telles l'amylase salivaire et la lipase linguale. Il est à noter que la digestion à ce niveau n'est que très superficielle. Ces aliments transformés vont porter le nom de bol alimentaire, qui va être propulsé, par déglutition vers l'estomac en passant par le pharynx et l'œsophage qui vont aider son déplacement par des contractions musculaires ordonnées, phénomène portant le nom de péristaltisme. Une fois dans l'estomac, le bol alimentaire va subir une digestion mécanique et une digestion chimique. En effet, il sera brassé et mélangé par péristaltisme avec le suc gastrique, qui possède plusieurs enzymes digestives et est très acide en raison de la forte présence d'acide chlorhydrique (HCl) sécrété par les cellules pariétales. Le faible pH du suc gastrique facilite l'action des enzymes digestives, telle que la pepsine. La résultante sera une pâte épaisse nommée le chyme. Les contractions de l'estomac vont permettre la progression du chyme vers l'intestin grêle pour y terminer sa digestion. Il sera constamment mélangé par segmentation avec la bile et plusieurs enzymes digestives. Les produits de digestion y seront alors totalement absorbés par les cellules de l'épithélium intestinal. Certains résidus végétaux non digérés seront métabolisés par les bactéries résidentes du côlon pour former de la vitamine K et certaines formes de la vitamine B qui seront absorbées. L'eau et les sels restants y subiront aussi le même sort. Les fèces seront ensuite expulsées, par péristaltisme, au niveau de l'anus (Marie et Hoen, 2012).

## 1.2 L'épithélium intestinal

### 1.2.1 L'épithélium de l'intestin grêle

La composition et l'organisation structurelle de l'épithélium varient selon sa position au sein du tractus gastro-intestinal. L'épithélium intestinal est organisé sous forme d'axes crypte-villosité tel qu'illustré sur le Schéma 1. La villosité comprend la majorité des cellules différenciées, soit les entérocytes (cellules absorbantes), les cellules entéroendocrines, les cellules caliciformes et les cellules tuft. La crypte quant à elle abrite les cellules souches, qui vont donner naissance aux cellules progénitrices, qui elles, vont se spécialiser en migrant le long de l'axe cryptal pour former tous les types cellulaires différenciés de l'épithélium

intestinal, incluant les cellules de Paneth, un type cellulaire retrouvé plutôt dans le fond des cryptes. L'entrée du chyme acide dans l'intestin grêle va stimuler la sécrétion du suc pancréatique alcalin, neutralisant ainsi l'acidité du chyme pour fournir un environnement optimal aux enzymes digestives. Certaines enzymes proviennent de la bile et du suc pancréatique et d'autres sont présentes sur la bordure en brosse des entérocytes. La présence des villosités, mais aussi des microvillosités retrouvées sur les cellules absorbantes augmente considérablement la surface de contact avec le chyme, améliorant ainsi le processus de digestion et d'absorption des nutriments (Marieb et Hoen, 2012).



### Schéma 1: Structure de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle

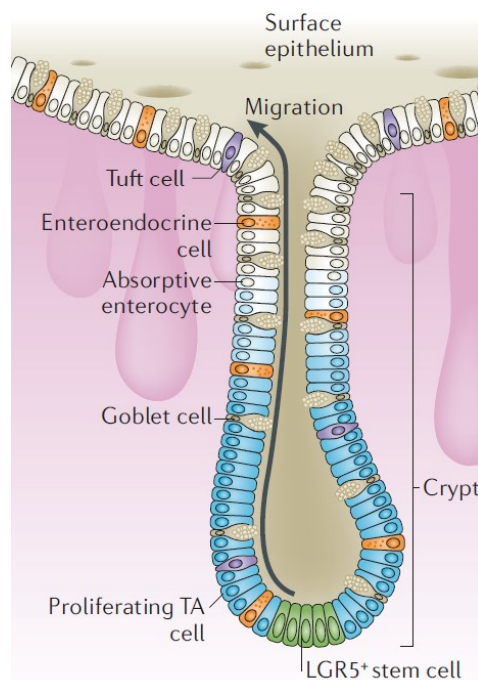
L'épithélium de l'intestin grêle contient des cellules souches  $LGR5^+$  intercalées de cellules de Paneth au fond de la crypte. Ces cellules souches vont donner naissance à des cellules progénitrices, qui proliféreront et se différencieront en migrant le long de la crypte. Les cellules différenciées, telles que les cellules absorbantes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules tuft se retrouvent au niveau de la villosité. Les cellules de Paneth sont les seules cellules différenciées à migrer et prendre place au fond de la crypte. Schéma tiré de Barker, 2014 avec autorisation.

### 1.2.2 L'épithélium du côlon

L'organisation structurelle de l'épithélium colique est différente de l'intestin grêle. En effet, il est dépourvu de villosités, et les cryptes qui le composent sont plus profondes que dans l'intestin grêle (Schéma 2). Les cellules souches qui y résident vont aussi donner naissance à des cellules progénitrices, qui se différencieront en colonocytes (cellules absorbantes), en cellules entéroendocrines, en cellules tuft ou en cellules caliciformes. Le côlon a pour principales fonctions digestives d'absorber l'eau restante associée aux aliments non digérés ainsi que d'absorber les métabolites produits par les bactéries de la flore intestinale, pour ne laisser que les fèces qui seront expulsées par l'anus. La flore bactérienne va être responsable de synthétiser certaines formes de vitamines B et la vitamine K en plus de métaboliser plusieurs sucres. Ces bactéries peuvent habiter le côlon en toute quiétude pour deux principales raisons. Tout d'abord, l'épaisse couche de mucus, qui joue un rôle de protection et de lubrification, empêche, en partie, l'adhésion des bactéries à l'épithélium intestinal. Elle empêche aussi les acides et gaz irritants relâchés par ces bactéries d'abimer les parois intestinales. De plus, les cellules épithéliales intestinales ont la capacité de répondre à certaines composantes bactériennes pour stimuler le recrutement de plusieurs cellules immunitaires, comme les cellules dendritiques, à la muqueuse, prévenant ainsi une éventuelle invasion bactérienne (Marieb et Hoen, 2012).

### 1.2.3 Les cellules épithéliales intestinales

L'épithélium intestinal se renouvelle tous les 4 à 5 jours. Trois jours suivant leur différenciation terminale, les cellules épithéliales intestinales vont atteindre l'apex de la villosité pour y mourir par anoïkose et être relarguées dans la lumière intestinale (Hall *et al.*, 1994). Tel que mentionné plus haut, l'épithélium de l'intestin grêle contient cinq types de cellules épithéliales différenciées: les entérocytes, qui font partie de la lignée absorbante, et les cellules entéroendocrines, caliciformes, de Paneth et tuft, qui font toutes partie de la lignée sécrétrice. L'épithélium du côlon contient les mêmes types cellulaires sauf les cellules de Paneth.



## Schéma 2: Structure de l'axe cryptal colonique

Contrairement à l'intestin grêle, les cryptes du côlon, qui sont plus profondes, sont dépourvues de cellules de Paneth et abritent tous les autres types cellulaires différenciés. La population des cellules caliciformes est aussi plus élevée dans l'épithélium colonique. Schéma tiré de Barker, 2014 avec autorisation.

Il est connu depuis quelques décennies déjà que les cellules souches intestinales sont pluripotentes et localisées au fond des cryptes (Cheng et Leblond, 1974). L'identification du marqueur de cellules souches intestinales « Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 » (LGR5) en 2007 par l'équipe d'Hans Clevers aux Pays-Bas (Barker *et al.*, 2007) a conduit à une caractérisation plus détaillée de la physiologie et de la fonction de ces cellules. En effet, ils ont montré par des essais de traçage de lignées que les cellules LGR5 positives, retrouvées au fond des cryptes intestinales, étaient bel et bien à l'origine de toutes les autres cellules épithéliales présentes dans les cryptes et villosités (Barker *et al.*, 2007). Pour y arriver, les cellules souches subissent une division asymétrique. La résultante sera une cellule souche, qui sera maintenue dans un état prolifératif et non différencié, ainsi qu'une cellule progénitrice. Cette dernière va se diviser 4 à 5 fois dans la crypte avant d'entreprendre son programme de différenciation terminale en migrant le long de l'axe cryptal (van der Flier et Clevers, 2009). Les cellules déterminées à se différencier en cellules

de Paneth vont migrer vers le bas de la crypte tandis que les autres types cellulaires vont tous migrer vers le haut de la villosité. Ce processus de différenciation est finement régulé et repose sur l'activation contrôlée de plusieurs voies de signalisation, notamment les voies Wnt/ $\beta$ -caténine, Notch, BMP, et EGFR/MAPK qui seront détaillées dans la prochaine section.

Les entérocytes, ou cellules absorbantes représentent plus de 80% de la population des cellules épithéliales intestinales (van der Flier et Clevers, 2009). Ce sont des cellules hautement polarisées. En effet, leur membrane apicale (celle qui fait face à la lumière intestinale) varie énormément de leur membrane basolatérale de par la présence de multiples microvillosités formant une structure communément appelée la bordure en brosse. La présence d'enzymes digestives, telles que la sucrase-isomaltase et la lactase, et de transporteurs protéiques au sein de cette bordure est primordiale pour finaliser les processus de digestion et d'absorption des nutriments (Engevik et R. Goldenring, 2018).

Les cellules entéroendocrines sont dispersées dans la muqueuse et ne comptent que pour approximativement 1% des cellules qui composent l'épithélium intestinal (van der Flier et Clevers, 2009). Elles sont responsables de coordonner la digestion intestinale par la sécrétion de plusieurs hormones peptidiques, telles que la cholécystokinine et la sécrétine, qui vont induire la sécrétion de la bile et des sucs pancréatiques, essentiels au processus de digestion (Marieb et Hoen, 2012).

Les cellules caliciformes sont le deuxième type cellulaire le plus abondant de l'intestin. Leur proportion en nombre augmente progressivement du début de l'intestin grêle jusqu'au côlon distal (Specian et Oliver, 1991). Elles sont responsables de la sécrétion des mucines, composantes principales du mucus intestinal qui protège l'épithélium de plusieurs micro-organismes et facilite le transit du contenu de la lumière intestinale. Les mucines sont définies comme étant des glycoprotéines constituées, en masse, d'au moins 50% de *O*-glycane (Johansson et Hansson, 2016). Elles peuvent s'associer entre elles et former des polymères « gel-like » formant une barrière protectrice continue. Dans l'intestin grêle, le mucus forme une simple couche, limitant l'accès des bactéries à l'épithélium. Il est à noter que cette couche est physiquement pénétrable par les bactéries, mais leur accès y est limité par la présence de molécules antimicrobiennes (Johansson et Hansson, 2016). Dans le côlon, le



mucus est présent en deux couches : la couche interne est compacte et impénétrable par les bactéries de la lumière intestinale tandis que la couche externe est beaucoup plus lâche et abrite plusieurs bactéries commensales. Les cellules caliciformes sécrètent aussi le peptide « Trefoil Factor 3 » (TFF3), un facteur très important pour la réparation de l'épithélium en cas de blessures et pour les défenses immunitaires (Aihara *et al.*, 2017).

Les cellules tuft sont des cellules chimiosensorielles de la lignée sécrétrice distribuées individuellement au sein de l'épithélium intestinal et en très faible quantité (<1%). Leur morphologie particulière permet de les différencier des autres types cellulaires de l'intestin. En effet, elles adoptent une forme cylindrique qui s'étrécit aux extrémités apicale et basale, en plus de présenter d'épaisses microvillosités sur leur partie apicale (von Moltke, 2018). Ces cellules agissent comme des senseurs chimiques et répondent à une multitude de signaux par la sécrétion de médiateurs biologiques, tels que l'acétylcholine et l'IL-25 (Schneider *et al.*, 2019). Ainsi, elles jouent un rôle central dans l'immunité intestinale. L'expression constitutive de l'IL-25 par les cellules tuft est nécessaire au maintien homéostatique des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2s) présentes dans la lamina propria, qui sont responsables de l'expression de l'IL-13, un régulateur positif de la différenciation des cellules tuft et de Paneth (von Moltke, 2016) et de la réponse immunitaire innée. Cette molécule agit en stimulant le recrutement de cellules immunitaires, telles que les éosinophiles. Quand l'homéostasie est rompue, comme dans un cas d'infection parasitaire, les cellules tuft vont être amenées à sécréter beaucoup plus d'IL-25, amplifiant ainsi la boucle d'activation IL-25/ILC2/IL-13 précédemment décrite.

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes de l'intestin grêle, adjacentes aux cellules souches, mais sont complètement absentes du côlon. Ce sont les seules cellules différenciées qui y prennent place. En effet, lors de leur processus de différenciation, elles sont amenées à exprimer les récepteurs à tyrosine kinase EphB2 et EphB3. Ces récepteurs génèrent une force répulsive lorsqu'ils interagissent avec leurs ligands, fortement exprimés par les cellules de la villosité, les obligeant ainsi à migrer au fond de la crypte (van der Flier et Clevers, 2009). Leur espérance de vie est d'au moins 3 semaines. Elles contiennent de larges granules de sécrétion, qui elles, contiennent plusieurs peptides antimicrobiens tels que les défensines et le lysozyme. Outre leur rôle important dans la composition de la flore

intestinale et de l'immunité innée, les cellules de Paneth jouent aussi un rôle essentiel dans le maintien homéostatique de la niche cryptale. En effet, ces cellules sécrètent plusieurs facteurs essentiels à la survie et à la prolifération des cellules souches, tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), un ligand de la signalisation des MAP-kinases, le Wnt3 (**W**ingless-**I**ntegration), un ligand de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et le DLL4, un ligand de la signalisation Notch (Sato *et al.*, 2011).

### 1.3 Les voies de signalisation importantes pour la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales

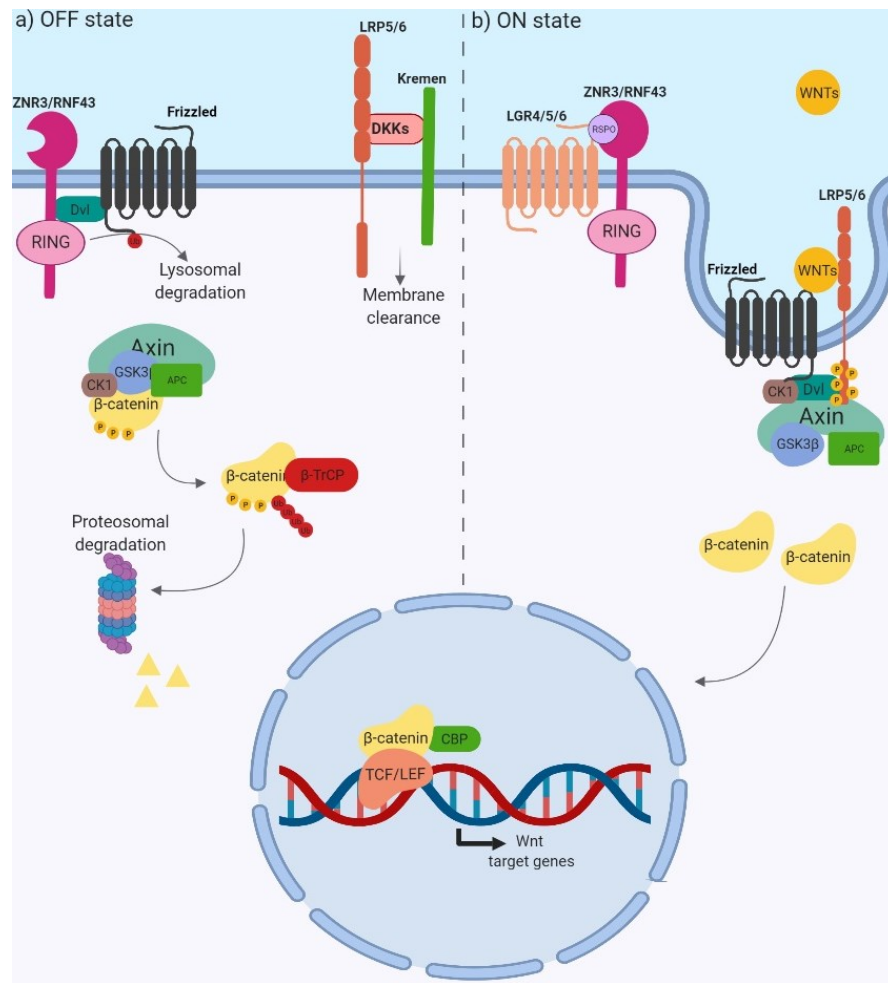
#### 1.3.1 La signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine

##### 1.3.1.1 Description de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine canonique joue un rôle central dans l'établissement de l'architecture tissulaire lors du développement embryonnaire. Elle est aussi un régulateur clé de l'homéostasie d'une multitude de tissus chez l'adulte (Clevers, 2006). Dans l'intestin, la signalisation Wnt est essentielle pour le maintien et la prolifération des cellules souches épithéliales en plus de contrôler le devenir cellulaire. La signalisation Wnt est normalement engagée par la liaison d'un ligand Wnt à un récepteur de la famille Frizzled (Fz) et à un co-récepteur. L'identité de ce co-récepteur peut être variable selon le contexte cellulaire et spécifiera la réponse cellulaire. L'identité du ligand Wnt est tout aussi importante pour la spécification de la réponse cellulaire. Chez l'humain, la famille Wnt est constituée de 15 protéines sécrétées, hautement glycosylées et riche en cystéine (Buechling et Boutros, 2011). Dans l'intestin, l'expression des facteurs Wnt3, Wnt6 et Wnt9b provient des cellules de Paneth ainsi que des cellules progénitrices tandis que l'expression des facteurs Wnt2b, Wnt4 et Wnt5b est due aux cellules du mésenchyme sous-jacent à l'épithélium (Gregorieff *et al.*, 2005). Il y a trois voies bien distinctes qui peuvent être initiées lorsque les facteurs Wnt se fixe à leurs récepteurs : la voie Wnt/ $\beta$ -caténine ou canonique, la voie Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) ou non-canonique ainsi que la voie Wnt/calcium.

La voie canonique (Schéma 3) est spécifiquement engagée par la liaison d'un Wnt aux récepteurs Frizzled et LRP5/6 (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 5/6). Les protéines transmembranaires Frizzled possèdent sept passages transmembranaires de type « Récepteur couplé aux protéines G » (RPCG) tandis que les protéines LRP5 et LRP6 ne possèdent qu'un passage transmembranaire et sont dotées d'une longue queue cytoplasmique pouvant être modifiée de façon post-traductionnelle. L'effecteur principal de cette voie est la  $\beta$ -caténine, une protéine normalement associée aux jonctions adhérentes. Quand elle se retrouve dans le cytoplasme, elle est spécifiquement recrutée par un complexe protéique nommé le complexe de dégradation, pour ensuite être envoyée à la dégradation par le protéasome. Le complexe de dégradation est composé des protéines d'échafaudage APC (Adenomatous Polyposis Coli) et Axine ainsi que des sérines/thréonines kinases CK1 $\alpha$  (casein kinase 1) et GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3). Quand la voie canonique est active, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est stabilisée, par l'inhibition du complexe de dégradation (voir section 1.3.1.1.1 pour la mécanistique), et sera libre de transloquer au noyau pour s'associer aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer binding Factor) afin d'activer la transcription des gènes cibles de la voie, tels que l'*AXIN2*, *CCND1*, *LGR5*, *MYC*, *SOX9*, etc.

La voie Wnt/PCP ou non-canonique quant à elle est indépendante de la  $\beta$ -caténine et des co-récepteurs LRP5/6. Cette voie a pour principale fonction de réguler le remodelage du cytosquelette d'actine afin d'assurer l'organisation vectorielle des tissus ainsi que d'assurer une migration cellulaire dirigée (Komiya et Habas, 2008). Les co-récepteurs NRH1, RYK, PTK7 et ROR2 ont tous été identifiés au fil des années comme co-récepteurs pour l'activation de cette voie de signalisation (Sasai *et al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2004 ; Nishita *et al.*, 2006). Le signal Wnt est transduit principalement par le récepteur Frizzled ainsi que la protéine cytoplasmique Dishevelled (DVL). Ainsi, grâce à ses domaines PDZ et DEP, DVL peut transduire, en parallèle, le signal Wnt vers deux sentiers bien distincts et complémentaires : l'activation des GTPases Rho et Rac, qui à leur tour stimuleront respectivement les kinases ROCK et JNK pour favoriser le remodelage du cytosquelette d'actine (Komiya et Habas, 2008).



### Schéma 3: Voie de signalisation Wnt/β-caténine

En l'absence de ligands Wnt, la β-caténine cytoplasmique est séquestrée et phosphorylée par les kinases du complexe de dégradation, entraînant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En présence de facteurs Wnt, le complexe de dégradation est recruté à la membrane et inhibé, stabilisant ainsi l'expression cytoplasmique de la β-caténine qui sera alors libre de transloquer au noyau, d'hétéromériser avec un membre de la famille TCF/LEF (TCF4 dans l'intestin) pour induire la transcription des gènes cibles de la voie. Schéma tiré de Raisch *et al.*, 2019 avec autorisation.

La voie Wnt/calcium est aussi considérée comme une voie non-canonique, puisqu'elle est indépendante de la β-caténine. Ses effecteurs bien distincts de la voie du PCP permettent de la considérer comme une voie de signalisation à part entière. Le signal Wnt est médié par le récepteur Frizzled et les petites protéines G qui y sont associées, ce qui va mener à

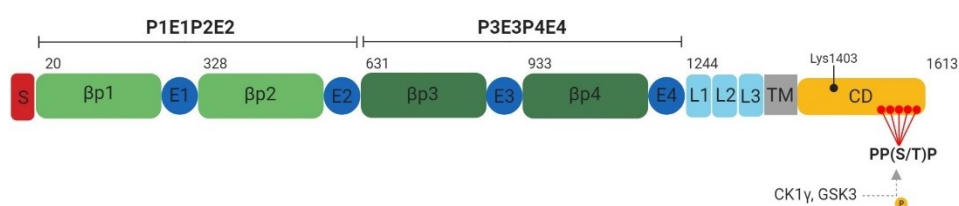
l'activation de DVL. DVL pourra à son tour activer la phospholipase C (PLC), qui par hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) produira du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG va activer les protéines kinases C (PKC) tandis que l'IP<sub>3</sub> stimulera la libération du calcium du réticulum endoplasmique. Cette voie de signalisation a pour fonction principale la modulation de l'adhésion et de la motilité cellulaire (Koch 2017).

#### 1.3.1.1.1 Rôle central du co-récepteur LRP6 dans l'activation de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine

Le co-récepteur transmembranaire LRP6 joue un rôle central dans l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Il sert essentiellement de plateforme pour le recrutement et l'inhibition du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine, effecteur principal de la signalisation Wnt canonique. En l'absence de facteurs Wnt, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique est dégradée activement par le protéasome. En effet, elle est phosphorylée sur son résidu sérine 45 par la CK1 $\alpha$  ainsi que sur ses résidus thréonine 41, sérine 37 et 33 par la GSK3 $\beta$ . Ces phosphorylations promeuvent la conjugaison de la  $\beta$ -caténine à l'ubiquitine par la  $\beta$ -TrCP (Beta transducin repeats-containing protein), qui sera finalement dégradée par le protéasome. La liaison des facteurs Wnt aux récepteurs Fz et LRP6 permet le recrutement membranaire de DVL qui se polymérisera, grâce à son domaine DIX, pour favoriser le recrutement de l'Axine et l'agrégation des complexes Fz/LRP6/DVL/Axine (MacDonald et He, 2012). LRP6 est ensuite phosphorylé sur sa queue cytoplasmique par les kinases CK1 $\gamma$  et GSK3 $\beta$ . Ces phosphorylations vont favoriser le recrutement de plusieurs autres molécules d'Axine et de GSK3 menant par le fait même à l'inhibition de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Le fort recrutement membranaire de plusieurs composantes du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine ainsi que de ses kinases vont libérer la  $\beta$ -caténine et empêcher sa dégradation. La  $\beta$ -caténine cytoplasmique stabilisée sera alors libre de transloquer dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles de la voie.

La phosphorylation de LRP6 est très importante pour la transduction du signal Wnt. En effet, cinq motifs PP(S/T)P riches en proline ont été identifiés comme étant cruciaux pour cette signalisation. Ils sont situés sur la queue cytoplasmique de LRP6, aux résidus sérine 1490,

thréonine 1530, thréonine 1572, sérine 1590 et sérine 1607 (Schéma 4). Plusieurs autres kinases que les kinases CK1 et GSK3 peuvent aussi phosphoryler ces résidus. Par exemple, il a été montré que la liaison de l'hormone parathyroïdienne (PTH) à son récepteur (PTH1R) peut induire la phosphorylation de LRP6 via la protéine kinase A (PKA), sur la sérine 1490 (Wan *et al.*, 2008). Plusieurs autres groupes de recherche ont aussi montré que LRP6 pouvait être phosphorylé par les « Mitogen-Activated Protein Kinases » (MAPK) ERK1/2, p38 et JNK résultant en une activation de la voie canonique en aval (Červenka *et al.*, 2011 ; Krejci *et al.*, 2012 ; Lemieux *et al.*, 2015). Ces évidences suggèrent que LRP6 serait un point de convergence entre plusieurs voies de signalisation et la signalisation dépendante de la  $\beta$ -caténine.



#### Schéma 4: Structure de la protéine transmembranaire LRP6

Le co-récepteur LRP6 contient quatre domaines «  $\beta$ -propeller » servant à la reconnaissance et la liaison des facteurs Wnt. Son domaine cytoplasmique (CD) contient cinq motifs PP(S/T)P phosphorylables par les kinases CK1 et GSK3 et important pour l'activation de la signalisation intracellulaire en aval. Schéma modifié et tiré de Raisch *et al.*, 2019 avec autorisation.

##### 1.3.1.2 Importance de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est essentielle pour l'homéostasie intestinale ainsi que dans le développement. En effet, la délétion du facteur de transcription TCF-4, le principal membre de la famille TCF/LEF exprimé dans l'intestin) chez la souris résulte en une perte des cryptes intestinales et donc, du compartiment prolifératif (Korinek *et al.*, 1998). De plus, la délétion conditionnelle de la  $\beta$ -caténine dans l'intestin de la souris conduit à une désorganisation complète du compartiment prolifératif en plus d'y causer un arrêt de la prolifération. Il est aussi possible d'observer une différenciation précoce des cellules de ce compartiment en cellules de la lignée entérocytaire (Fevr *et al.*, 2007). Aussi, la surexpression de Dkk1, un inhibiteur de la voie Wnt, chez la souris, résulte en une diminution

du nombre de cryptes et de villosités ainsi que de la taille de ces villosités dans l'intestin. Des défauts de prolifération et de différenciation y sont aussi observés (Pinto *et al.*, 2003). Pris ensemble, ces résultats démontrent que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est absolument essentielle au maintien des cellules souches intestinales.

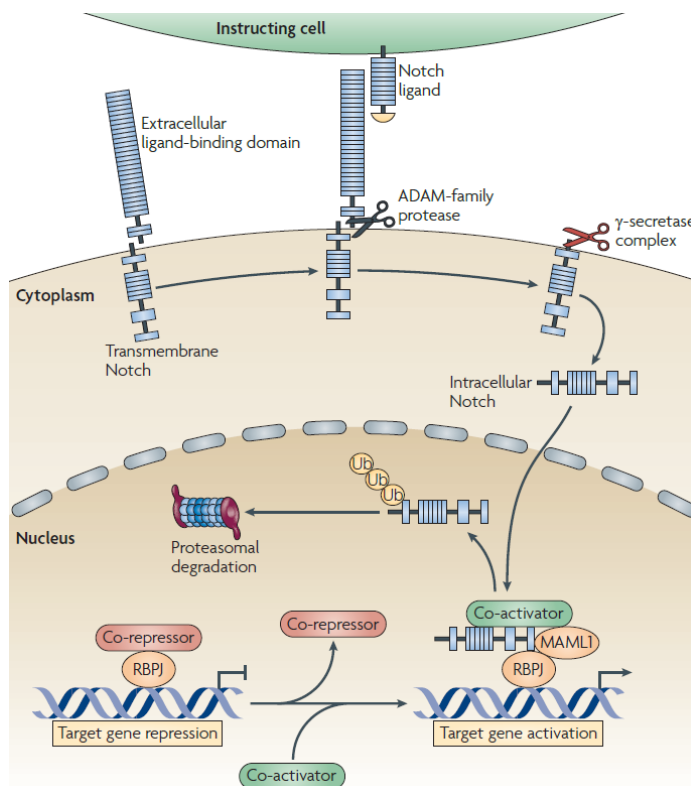
### 1.3.2 La Signalisation de Notch

#### 1.3.2.1 Description de la signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est particulièrement importante pour le processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales. La signalisation Notch se base sur la transmission de signaux entre des cellules adjacentes. De ce fait, il y aura toujours une cellule émettrice ainsi qu'une cellule réceptive. Il existe quatre récepteurs Notch (1-4) ainsi que cinq ligands séparés en deux groupes : 1- les ligands Delta-like 1,3 et 4 (DLL1,2 et 4); 2- les ligands Jagged 1 et 2 (JAG1 et JAG2). La voie est initiée par la liaison du ligand de la cellule émettrice au récepteur de la cellule réceptive, entraînant un clivage protéolytique de la partie extracellulaire du récepteur Notch par la métalloprotéase ADAM10 (A desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10). Il s'ensuit un deuxième clivage protéolytique de la partie intracellulaire du récepteur Notch par la  $\gamma$ -sécrétase entraînant la libération du fragment NICD (Notch Intracellular Domain) dans le cytoplasme qui transloquera vers le noyau. Une fois dans le noyau, NICD va s'associer à la protéine RBPJ (Recombining binding protein suppressor of hairless), favorisant le recrutement de son co-activateur transcriptionnel, Mastermind, pour induire la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation Notch tels que *HES1*, qui est un répresseur transcriptionnel (Demitrack et Samuelson, 2016) (Schéma 5). Il est connu que la signalisation Notch promeut la différenciation des cellules absorbantes par l'inhibition de l'expression du facteur ATOH1, essentiel à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice, via *HES1*.

### 1.3.2.2 Importance de cette voie dans le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches

Plusieurs études ont démontré que la voie de signalisation Notch est aussi impliquée dans le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches. En effet, les cellules souches LGR5<sup>+</sup> expriment les récepteurs Notch1 et Notch2 à leur surface alors que les cellules de Paneth avoisinantes expriment les ligands DLL1 et DLL4 nécessaires à l'activation de la voie Notch, suggérant un rôle important de cette signalisation pour l'homéostasie des cellules souches (Spit *et al.*, 2018). En effet, l'inhibition de la signalisation Notch chez la souris entraîne une perte rapide des cellules souches LGR5<sup>+</sup> ainsi qu'une hyperplasie des cellules de la lignée sécrétrice au détriment de la lignée absorbante (VanDussen *et al.*, 2012). À l'inverse, l'activation constitutive de la voie Notch empêche la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice en plus d'élargir la population des cellules progénitrices prolifératives (Fre *et al.*, 2005).



#### Schéma 5: Voie de signalisation Notch

La signalisation Notch est initiée par la liaison des ligands Notch à leur récepteur extracellulaire. Il va s'ensuivre deux clivages protéolytiques, résultant en la libération du fragment NICD qui sera alors libre de transloquer



dans le noyau. Une fois dans le noyau, il s'associera à son complexe transcriptionnel pour induire la transcription des gènes cibles de la voie. Schéma tiré de Amsen *et al.*, 2009 avec autorisation.

### 1.3.3 La signalisation des BMP

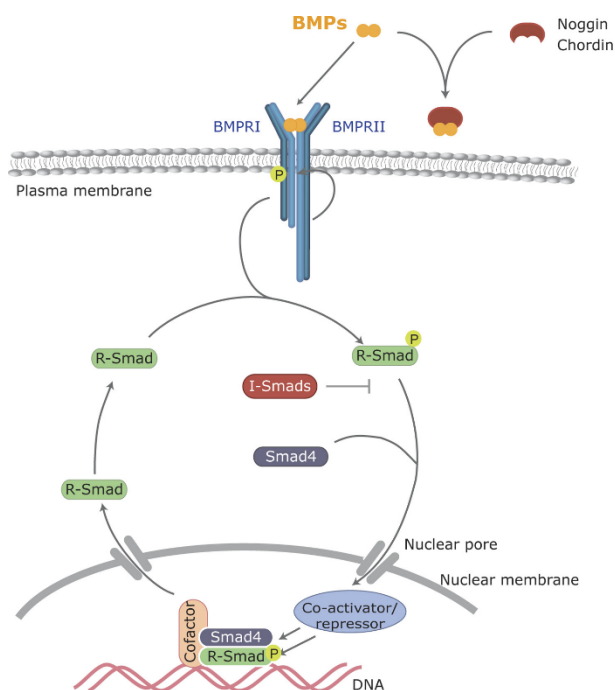
#### 1.3.3.1 Description de la signalisation des BMP

Les facteurs de croissance BMP (Bone Morphogenic Protein) ont été découverts pour leur capacité à induire la formation des os. Aujourd'hui, ils sont connus pour être importants dans le développement ainsi que pour l'homéostasie de différents tissus tels que l'intestin (Reddi, 2005). Les BMP initient la transduction du signal en se liant aux récepteurs des BMP de type I et II (BMPRI-2) qui forment des hétérotétramères. Ce sont des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. La liaison des BMP va induire la transphosphorylation de BMPRI par BMPRII qui lui, est constitutivement actif. BMPRI va ensuite phosphoryler les facteurs de transcription R-SMAD1/5/8 (receptor-regulated SMAD) qui vont s'associer au Co-SMAD4 (core mediator SMAD4) pour transloquer au noyau et s'associer à des coactivateurs ou corépresseurs transcriptionnels afin de réguler l'expression de différents gènes (Schéma 6). La signalisation des BMP peut être régulée négativement par des antagonistes extracellulaires tels que le Noggin, la Follistatine et Gremlin1 (Spit *et al.*, 2018).

#### 1.3.3.2 Importance de cette voie dans le maintien, la prolifération et la différenciation des cellules souches

La signalisation des BMP est importante pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Les facteurs BMP peuvent être exprimés par le mésenchyme sous-jacent à l'épithélium intestinal ainsi que par les cellules épithéliales des villosités intestinales (Haramis *et al.*, 2004; Hardwick *et al.*, 2004). La signalisation des BMP est finement régulée au sein des cryptes intestinales par différents antagonistes, tels que Gremlin1/2, Chordin, Noggin, et Angptl2, exprimés par le mésenchyme (Horiguchi *et al.*, 2017; Kosinski *et al.*, 2007; Sneddon *et al.*, 2006). Lorsqu'activée, elle régule négativement la formation des cryptes en plus d'être essentielle à la différenciation terminale des cellules intestinales de la lignée sécrétrice (Haramis *et al.*, 2004; Auclair *et al.*, 2007). La suractivation de cette signalisation par l'ajout de BMP ou le retrait de Noggin sur des organoïdes de souris en culture empêche

l'amplification des cellules souches LGR5<sup>+</sup> et induit la perte d'expression des marqueurs de cellules souches *Lgr5*, *Olfm4* et *Ascl2* indépendamment de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Qi *et al.*, 2017).



### Schéma 6: Voie de signalisation des BMP

La liaison des facteurs BMP aux récepteurs BMPRI et BMPRII induit la transphosphorylation de la partie cytoplasmique de BMPRI qui pourra alors phosphoryler les R-SMAD. Une fois phosphorylés, les R-SMAD pourront s'associer à SMAD4, transloquer au noyau pour s'associer à leurs co-facteurs pour favoriser la transcription des gènes cibles de la voie. Schéma adapté et tiré de Gámez *et al.*, 2013 avec autorisation.

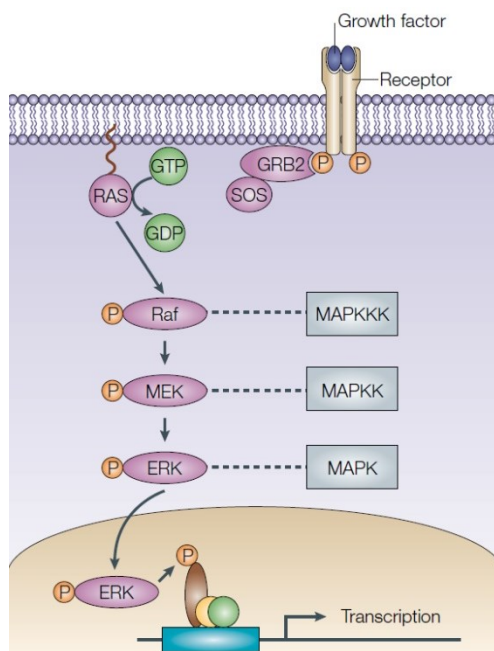
#### 1.3.4 La signalisation EGFR/MAPK

##### 1.3.4.1 Description de la signalisation EGFR/MAPK

Les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) sont des sérines/thréonines kinases importantes pour la transmission de signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule pour induire une multitude de réponses cellulaires essentielles entre autres pour la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Chez les mammifères, il existe 14 MAPK

séparées en sept groupes bien distincts. Les kinases ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2) font partie des MAPK les plus étudiées à ce jour. Cette signalisation est activée principalement par la liaison de différents facteurs de croissance à des récepteurs membranaires qui possèdent une activité tyrosine kinase. Dans l'intestin, cette voie est particulièrement activée par les facteurs de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) et TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor alpha).

La liaison de l'EGF ou du TGF $\alpha$  au récepteur EGFR va induire son homodimérisation, activant ainsi son activité tyrosine kinase intrinsèque. La phosphorylation de plusieurs tyrosines dans la partie C-terminale de l'EGFR sera ainsi induite. Ces phosphorylations vont favoriser le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices ainsi que de la GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) SOS (Son of Sevenless) afin d'activer la petite protéine G RAS. Pour information, l'EGF peut aussi activer plusieurs autres cascades de signalisation, telles que PI3K/AKT, MAPK/JNK, JAK/STAT et la signalisation de la PLC. L'activation de RAS se fait par l'échange de son GDP (Guanosine DiPhosphate), par du GTP (Guanosine TriPhosphate). Cette nouvelle interaction permet à RAS de recruter et d'activer la MAPK kinase kinase RAF, qui, par phosphorylation, activera à son tour les MAPK kinases à double spécificité MEK1/2. Les kinases MEK1/2 pourront finalement activer, par phosphorylation du motif Thr-Glu-Tyr, les MAPK ERK1/2 (Cargnello et Roux, 2011) (Schéma 7). Les kinases ERK1/2 pourront alors phosphoryler plusieurs autres kinases cytosoliques telles que les MNK1/2 (MAPK-interacting Kinase 1/2) et les RSK (Ribosomal S6 Kinase). MNK1, et potentiellement MNK2, phosphoryle l'eIF-4E (Eukaryotic translation Initiation Factor 4E) sur la sérine 209, ce qui augmente son affinité pour la coiffe des ARNm, augmentant ainsi l'efficacité de l'initiation de la traduction protéique (Wendel *et al.*, 2007). Les RSK activées transloquent au noyau pour phosphoryler plusieurs facteurs de transcription tels que c-Fos, SRF et CREB (Chen *et al.*, 1993; Xin *et al.*, 1996). Les kinases ERK1/2 vont aussi transloquer au noyau pour induire, par la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription (Elk-1, c-Myc, c-Fos, etc.), l'expression de plusieurs gènes associés à la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaire, dépendamment du contexte cellulaire (Cargnello et Roux, 2011).



### Schéma 7: Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK

La liaison de facteurs de croissance, tel que l'EGF, induit la phosphorylation des RTK et le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices, telles GRB2 et SOS entraînant l'échange de GDP par du GTP sur RAS. Cette forme active de RAS pourra induire l'initiation d'une cascade de phosphorylations activatrices sur les kinases RAF, MEK et ERK, qui pourra alors phosphoryler différents partenaires cytosoliques avant de transloquer au noyau pour phosphoryler et activer différents facteurs de transcription. Tiré de Kim et Bar-Sagi, 2004 avec autorisation.

#### 1.3.4.2 Importance de cette voie dans le maintien et la prolifération des cellules souches et progénitrices

Plusieurs études ont démontré que la signalisation de l'EGF/TGF $\alpha$  est essentielle pour la survie et la prolifération des cellules souches de l'intestin. Le mésenchyme sous-jacent ainsi que les cellules de Paneth sont responsables de la production et de la sécrétion de l'EGF au sein de la crypte intestinale (Sato *et al.*, 2011; Farin *et al.*, 2012). De façon complémentaire, l'EGFR est fortement exprimé par les cellules souches et progénitrices de la crypte intestinale, entraînant une forte activation de la signalisation de l'EGF (Yang *et al.*, 2017). Par exemple, l'infusion gastrique d'EGF chez la souris induit fortement la prolifération de l'épithélium de l'intestin grêle (Marchbank *et al.*, 1995). À l'inverse, le blocage de l'EGFR ou de la cascade signalétique RAS/MAPK empêche la prolifération des cellules souches

intestinales chez la drosophile (Biteau et Jasper, 2011). Dans le même ordre d'idées, l'inhibition de la signalisation de l'EGF dans des organoïdes intestinaux en culture induit la quiescence des cellules souches intestinales LGR5+ prolifératives et l'arrêt de croissance des organoïdes (Basak *et al.*, 2016).

## 1.4 Le cancer colorectal

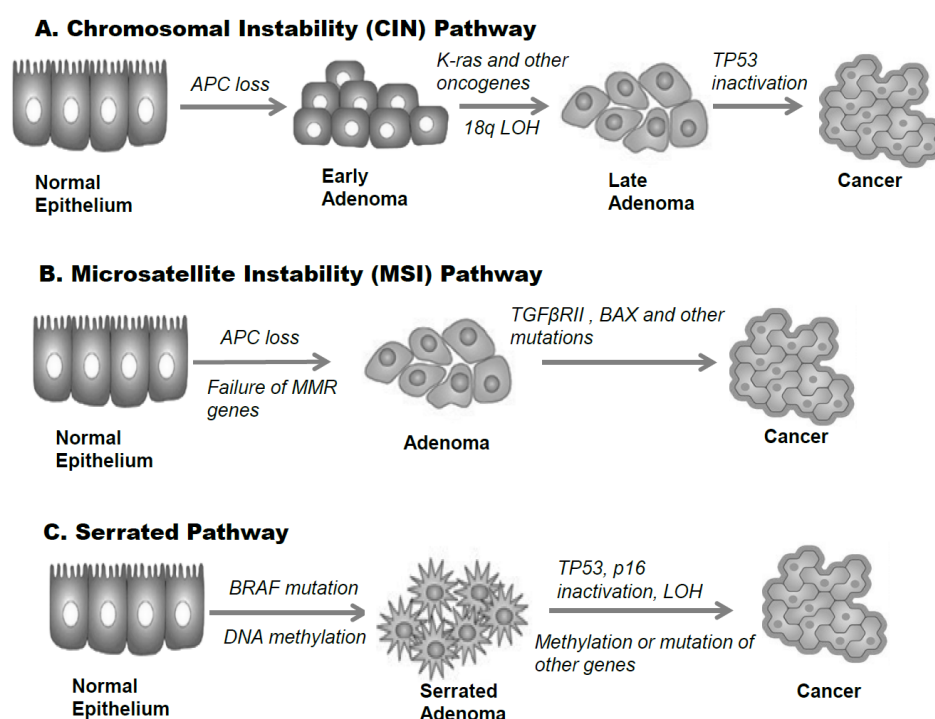
### 1.4.1 Généralités

Le cancer colorectal sera, en 2020, la troisième forme de cancer la plus souvent diagnostiquée et la deuxième cause de décès par cancer au Canada (Brenner *et al.*, 2020). Plusieurs facteurs de risques du cancer colorectal ont été identifiés jusqu'à ce jour. Ces facteurs peuvent être démographiques, environnementaux ou comportementaux et incluent les maladies inflammatoires de l'intestin, l'index de masse corporelle, l'activité physique ainsi que la consommation de cigarettes et de viande rouge (Jonhson *et al.*, 2013). La génétique est aussi un facteur de risque très important pour le développement de cancers colorectaux. En effet, 20 à 30% de tous les cas de ce type de cancer sont dus, en partie, aux antécédents familiaux (Rustgi, 2007). La polypose adénomateuse familiale (PAF) est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante qui mène, à l'initiation et à la progression de plusieurs milliers de polypes dans le côlon. Le syndrome de Lynch ou le cancer du côlon héréditaire non polyposique est une autre forme de maladie héréditaire à transmission autosomique dominante. Elle est due à des mutations dans des gènes du système de réparation de l'ADN tels que *MLH1* (MutL homolog1), *MSH2* (MutS homolog 2) et *MSH6* (MutS homolog 6), favorisant l'accumulation de mutations génétiques (Rustgi, 2007).

### 1.4.2 Principaux mécanismes de carcinogenèse colorectale sporadique

Les cancers colorectaux qui ne sont pas dus à l'hérédité sont dits sporadiques. Ils représentent 70 à 80% des cancers colorectaux (Karoui, *et al.*, 2007). La séquence adénome-cancer a premièrement été décrite, dans les années 1990, comme étant un processus linéaire et séquentiel (Fearon et Vogelstein, 1990). Ce modèle se base sur l'accumulation de défauts génétiques qui entraînent la formation d'une crypte dysplasique puis d'adénome ainsi que

leur progression en un adénocarcinome et finalement en carcinome. Trois voies moléculaires principales menant au développement d'un cancer colorectal ont été décrites : 1- l'instabilité chromosomique (CIN); 2- l'instabilité des microsatellites (MSI); et 3- la méthylation des îlots CpG (CIMP) (Mundade *et al.*, 2014) (Schéma 8). Il est important de noter que, généralement, ces types de cancers répondent différemment aux traitements chimiothérapeutiques, d'où l'importance d'une classification moléculaire robuste.



**Schéma 8: Voies moléculaires menant au développement du cancer colorectal**

Trois voies moléculaires basées sur l'accumulation séquentielle de défauts génétiques ont été décrites pour expliquer l'initiation et la progression tumorale colorectale : **1-** La voie de l'instabilité chromosomique; **2-** La voie de l'instabilité des microsatellites; **3-** La voie de méthylation des îlots CpG (CIMP) ou « Serrated Pathway ». Tiré de Mundade *et al.*, 2014 avec autorisation.

#### 1.4.2.1- L'instabilité chromosomique (CIN)

La voie de l'instabilité chromosomique survient dans environ 65-70% des cancers colorectaux sporadiques (Lengauer *et al.*, 1999). Elle est caractérisée par la présence d'un nombre anormal de chromosomes (aneuploïdie) ainsi qu'une perte d'hétérozygotie. L'impact fonctionnel de ces caractéristiques se trouve à être l'accumulation d'un ensemble spécifique de mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que dans des oncogènes, entraînant l'activation de plusieurs voies de signalisation critiques à l'initiation et à la progression du cancer colorectal. Trois mécanismes ont été identifiés comme pouvant contribuer à l'instabilité chromosomique lorsqu'ils sont dérégulés: 1- la ségrégation des chromosomes; 2- la régulation des télomères; 3- la réponse au dommage à l'ADN (Pino et Chung, 2010). L'initiation tumorale dans la voie CIN est généralement caractérisée par des mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeurs *APC*, et la progression, par l'activation de proto-oncogènes, tels que *KRAS*. Finalement, des pertes de fonctions dans *TP53* vont conférer un caractère invasif à ces tumeurs (Mundade *et al.*, 2014).

#### 1.4.2.2 - L'instabilité des microsatellites (MSI)

La voie de l'instabilité des microsatellites survient dans environ 10-15% des cancers colorectaux sporadiques (Mundade *et al.*, 2014). Elle est caractérisée par la présence de plusieurs mutations génétiques dues à des défaillances dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR). L'inactivation des gènes impliqués dans le MMR peut se faire par la méthylation de leur promoteur ou par des mutations ponctuelles. Les cellules qui présentent des défauts du MMR ont tendance à accumuler des mutations dans des microsatellites localisés dans des régions codantes de l'ADN. Cette voie est donc initiée par l'apparition de défaillances dans des gènes du MMR combinée à des pertes de fonctions du gène suppresseur de tumeurs *APC*. Plusieurs autres mutations de gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation de proto-oncogènes vont permettre la progression de ce type de tumeur vers un cancer (Mundade *et al.*, 2014).

#### 1.4.2.3 - La méthylation des îlots CpG (CIMP)

La voie de la méthylation des îlots CpG (ou le « Serrated Pathway ») est caractérisée par la présence d'une mutation activatrice dans le gène *BRAF* (V600E) et par la répression épigénétique de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire, tels que le gène codant pour l'inhibiteur p16 (*CDKN2A*). Ce gène est un des gènes suppresseurs de tumeurs les plus étudiés. C'est un inhibiteur des kinases CDK4 et CDK6, des kinases importantes pour la phosphorylation de Rb et donc pour la transition G1/S du cycle cellulaire, via la libération de facteurs de transcription de la famille E2F. La mutation ponctuelle V600E de la kinase BRAF entraîne son activation constitutive en plus de la rendre insensible aux mécanismes de rétro-inhibition. La conséquence de cette activation est une suractivation de la voie MAPK/ERK en aval qui pourra induire une prolifération cellulaire incontrôlée et la résistance à l'apoptose (Mundade *et al.*, 2014). Cette voie est donc initiée par une mutation activatrice de *BRAF* et l'accumulation des méthylations dans l'ADN. La progression s'ensuit par l'acquisition de mutations inactivatrices dans différents gènes suppresseurs de tumeurs tels que *TP53* ou *CDKN2A* (Mundade *et al.*, 2014).

#### 1.4.3 Dérégulation des voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et RAS/MAPK

##### 1.4.3.1 Mutations inactivatrices (« perte de fonction ») dans le gène suppresseur de tumeur APC

Des mutations germinales dans le gène suppresseur de tumeurs *APC* résultent en l'apparition de la polypose adénomateuse familiale, pathologie caractérisée par l'apparition de milliers de polypes au niveau du côlon dans ses formes les plus graves. Des mutations inactivatrices d'*APC* sont aussi retrouvées dans 80% de tous les cancers colorectaux sporadiques, suggérant qu'il est un acteur clé de l'initiation et de la progression de ce type de cancer (Goss et Groden, 2000). En effet, les mutations d'*APC* sont les altérations génétiques qui surviennent le plus rapidement lors de l'initiation tumorale intestinale (Jen *et al.*, 1994). La plupart des mutations recensées d'*APC* surviennent dans sa partie centrale et sont des mutations non-sens, qui entraînent l'expression d'une protéine tronquée pour sa partie C-terminale. La partie centrale d'*APC* contient des motifs structuraux importants pour la séquestration et la dégradation de la  $\beta$ -caténine (Goss et Groden, 2000). Ainsi, la forme



tronquée d'APC entraîne une déstabilisation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine et une stabilisation de sa forme cytoplasmique ce qui mène éventuellement à une augmentation de la transcription des gènes cibles de la signalisation dépendante de la  $\beta$ -caténine et à une hyperprolifération cellulaire. Par exemple, l'inactivation conditionnelle d'*APC* dans l'intestin de souris mène à l'élargissement des cryptes intestinales, à une augmentation de la prolifération cellulaire associée à une augmentation de l'expression de c-Myc et de la cycline D1, ainsi qu'à une diminution de la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Andreu *et al.*, 2005). D'autres rôles que la régulation des niveaux d'expression de la  $\beta$ -caténine ont aussi été attribués à APC au fil des années, notamment la ségrégation des chromosomes (Goss et Groden, 2000). Ainsi, un défaut d'APC contribuerait à l'apparition de l'instabilité génomique et par le fait même au développement de cancers colorectaux et ce, indépendamment de son effet sur la  $\beta$ -caténine.

#### 1.4.3.2 Mutations activatrices (« gain de fonction ») dans les oncogènes *KRAS* et *BRAF*

*KRAS* est un proto-oncogène activé dans plus de 45% des cas de cancer colorectal. Les mutations activatrices de *KRAS* sont les plus souvent observées au niveau de son résidu G12 et altèrent ses fonctions GTPase intrinsèques en plus d'empêcher ses interactions avec différentes GAP (GTPase-Activating Protein) (Porru *et al.*, 2018). Ainsi, il est continuellement retrouvé sous sa forme active (liée au GTP) et promeut l'activation de ses effecteurs en aval, tels que RAF et PI3K. La kinase *BRAF* est aussi connue pour être affectée par la mutation *BRAFV600E*, qui rend la kinase constitutivement active, dans 10% des cancers colorectaux (Tie *et al.*, 2011). Il est à noter que les mutations de *KRAS* et *BRAF* sont mutuellement exclusives, ce qui suggère que c'est la signalisation MEK/ERK en aval de ces kinases qui est importante pour le cancer colorectal. Plusieurs groupes de recherche ont pu montrer que la signalisation RAS/RAF/MEK/ERK est importante pour la prolifération cellulaire et la tumorigenèse intestinale. En effet, l'activité de ERK1/2 est fortement stimulée dans des cellules N1H3T3 transformées par *v-raf* une forme oncogénique de RAF (Kyriakis *et al.*, 1992). De plus l'utilisation d'ARN antisens complémentaires à p42/p44 (ERK1/2) empêche la prolifération de fibroblastes *in cellulo* (Pagès *et al.*, 1993). Aussi, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de MEK1/2, le CI-1040, inhibe la croissance de tumeurs

colorectales de provenance murine ou humaine chez la souris (Sebolt-Leopold *et al.*, 1999). Finalement notre groupe a aussi montré que l'activation constitutive de MEK1 était suffisante pour induire la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) de cellules épithéliales intestinales et pour promouvoir le potentiel tumoral, l'invasion cellulaire ainsi que l'apparition de métastases chez la souris (Lemieux *et al.*, 2009). Pris ensembles ces résultats montrent que les oncogènes *KRAS* et *BRAF* sont aussi des acteurs essentiels de la tumorigenèse intestinale.

#### 1.4.3.3 LRP6 : une protéine au carrefour des signalisations Wnt/ $\beta$ -caténine et RAS/MAPK

Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels la signalisation RAS/RAF/MEK/ERF pouvait contribuer à la tumorigenèse intestinale, notre groupe de recherche s'est intéressé à caractériser le processus de TEM induit par l'expression d'une forme oncogénique de *KRAS*, de *BRAF* ou par l'expression de la forme constitutive active de MEK1 dans des cellules épithéliales intestinales (CEI) normales. De manière intéressante, les cellules transformées par l'activation oncogénique de la voie RAS/RAF/MEK/ERK présentent une relocalisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Cette expression nucléaire de la  $\beta$ -caténine est associée à une hausse de l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF dans ces mêmes cellules, une hausse qui est MAPK-dépendante. Aussi, une augmentation de la phosphorylation du co-récepteur membranaire LRP6 sur ses résidus sérine 1490 et thréonine 1572 a été également observée dans ces cellules transformées, ce qui suggère effectivement que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est stimulée (Lemieux *et al.*, 2015). En effet, LRP6 participe à la liaison des facteurs Wnt et à l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine tel que décrit dans les sections précédentes. Les phosphorylations de sa queue cytoplasmique par les kinases CK1 et GSK3, notamment sur ses motifs PP(S/T)P, sont cruciales pour la stabilisation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine et l'activation de la signalisation en aval (Niehrs et Shen, 2010). De plus, l'inhibition d'expression de LRP6 par des shARN dans les cellules transformées par MEK1 réduit significativement leur capacité à croître en indépendance d'ancrage (Lemieux *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que la signalisation RAS/RAF/MEK/ERF utilise la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pour induire la transformation des CEI normales, possiblement via la

phosphorylation du co-récepteur LRP6. Finalement, il est pertinent de mentionner que la phosphorylation de LRP6 est fortement augmentée dans les adénomes et adénocarcinomes colorectaux humains (Lemieux *et al.*, 2015) suggérant l'implication de cette phosphorylation dans la tumorigénèse intestinale.

## 2. Hypothèse et objectifs

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent l'hypothèse que la phosphorylation de LRP6 contribue au signal oncogénique induit par la voie KRAS/BRAF/MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales et donc dans le développement du cancer colorectal.

L'objectif principal était de déterminer les fonctions de LRP6 dans le maintien des propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales humaines mutées ou non pour les oncogènes *KRAS* ou *BRAF* et de caractériser le(s) rôle(s) de sa phosphorylation.

Les objectifs spécifiques de mon projet étaient donc de :

- 1- Analyser le rôle de la voie RAS/MAPK dans la régulation de l'expression et de la phosphorylation de LRP6 dans différentes lignées cancéreuses colorectales humaines bien établies.
- 2- Analyser l'impact de la baisse d'expression de LRP6 sur la prolifération, la capacité à croître en indépendance d'ancrage et la survie clonogénique des cellules cancéreuses colorectales mutées ou non pour *KRAS* ou *BRAF*.

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1 Matériel

##### 3.1.1 Anticorps

L'anticorps ciblant la forme totale de LRP6 (#2560), sa forme phosphorylée sur la sérine 1490 (S1490, #2568) et la forme phosphorylée de pRB sur la sérine 780 (#9307) proviennent de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). L'anticorps ciblant la forme total de la protéine RB (554136) a été acheté chez BD Biosciences (San Jose, CA, USA). L'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de LRP6 sur la thréonine 1572 (07-2187) et l'anticorps reconnaissant la  $\beta$ -actine (MAB1501R) ont été achetés chez Millipore (Billerica, MA, USA). L'anticorps contre les formes phosphorylées de ERK1/2 (M8159) a été obtenu de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Les anticorps ciblant p27 (M-197) et ERK2 (C-14, sc-154) proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps secondaires anti-lapin « Horseradish Peroxidase » (HRP) (NA931V) et anti-souris HRP (NA934V) ont été achetés de GE Healthcare Life Sciences (Mississauga, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-lapin phosphatase alcaline (PA) proviennent de Promega (Madison, WI, USA). Tous les anticorps ont été utilisés selon les recommandations des fabricants.

##### 3.1.2 Inhibiteurs et molécules

L'inhibiteur des kinases ERK1/2, le SCH772984 (19166) a été acheté chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). La doxycycline hyclate (D9891) a été obtenu de Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Le MTT (475989) a été acheté de EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada). L'EGF humain recombinant (236-EG) provient de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

## 3.2 Méthodes

### 3.2.1 Culture cellulaire

#### 3.2.1.1 Lignées cellulaires utilisées

La lignée cellulaire Caco-2/15 (gracieuseté du Pr Jean-François Beaulieu, FMSS, Université de Sherbrooke) provient d'un clone isolé de la lignée cellulaire Caco-2 (HTB-37™) qui, elle, a été achetée de l'ATCC® (Manassas, VA, USA); la lignée cellulaire a été isolée d'un adénocarcinome colorectal humain. Elles sont cultivées à sous-confluence pour éviter leur différenciation dans du milieu DMEM (319-005-CL, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) contenant 5% sérum fœtal bovin (FBS), 1% v/v Glutamax (35050-061, Life Technologies), 1% v/v HEPES (330-050-EL, Wisent) et 0,5% v/v pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent).

La lignée cellulaire épithéliale HCT116 (CCL-247™) provient de l'ATCC®. Elle a été isolée d'un carcinome colorectal humain et est cultivée dans du milieu McCoy's 5A (317-010-CL, Wisent) contenant 5% sérum fœtal bovin (FBS), 1% v/v Glutamax (35050-061, Life Technologies), 1% v/v HEPES (330-050-EL, Wisent) et 0,5% v/v pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent).

La lignée cellulaire HT-29 (HTB-38™) a été achetée de l'ATCC® et a été isolée d'un adénocarcinome colorectal humain. Les cellules sont cultivées dans du McCoy's 5A (317-010-CL, Wisent) contenant 5% sérum fœtal bovin (FBS), 1% v/v Glutamax (35050-061, Life Technologies), 1% v/v HEPES (330-050-EL, Wisent) et 0,5% v/v pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent).

La lignée cellulaire SW-48 (CCL-231™) a été obtenue de l'ATCC®. Ce sont des cellules provenant d'un adénocarcinome colorectal humain (Duke's type C, grade IV). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (319-005-CL, Wisent) contenant 10% sérum fœtal bovin (FBS), 1% v/v Glutamax (35050-061, Life Technologies), 1% v/v HEPES (330-050-EL, Wisent) et 0,5% v/v pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent).

La lignée cellulaire embryonnaire rénale humaine HEK 293T (CRL-3216™) a aussi été obtenue de l'ATCC®. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (319-005-CL, Wisent) contenant 10% sérum fœtal bovin (FBS), 1% v/v Glutamax (35050-061, Life Technologies),

1% v/v HEPES (330-050-EL, Wisent) et 0,5% v/v pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent).

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées dans un incubateur à 37 °C et 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

### *3.2.1.2 Production de lentivirus*

Pour produire des lentivirus, des cellules 293T sontensemencées dans un pétri de 10cm de diamètre à une dilution 1/5. Le lendemain, deux solutions sont préparées pour la transfection. Dans la première, 6   g des plasmides exprimant les protéines d'encapsidation virale (PLP1, PLP2 et PLP-VSVG) ainsi que du plasmide codant le shARN spécifique à la protéine d'intérêt (pLKO-Tet-On) dans 1,5 mL d'Opti-MEM (31985-070, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pour la deuxième solution, on dilue 48   L de lipofectamine2000 (11668-019, Thermo Fisher Scientific) dans 1,5 mL d'Opti-MEM. Après 5 min d'incubation, on mélange doucement les deux solutions, qu'on laisse reposer pendant 20 min. Les cellules 293T sont par la suite rincées deux fois au PBS et une fois à l'Opti-MEM pour enlever toute trace de sérum. La nouvelle solution est ajoutée sur les cellules, qui sont ensuite remises à l'incubateur pendant environ 4 h. Après ce temps, la solution d'Opti-MEM est remplacée par 7 mL de DMEM. Les virus sont récoltés après 48 h, passés sur un filtre 0,45   m (4184, Pall, Port Washington, NY, USA) et entreposés à -80   C.

### *3.2.1.3 Infection virale des cellules colorectales cancéreuses*

Les cellules sont passées, la journée avant l'infection, à une dilution d'entretien normale. Pour infecter les cellules, le milieu de culture est retiré et 1mL du filtrat lentiviral contenant 4  g/mL de polybrène (bromure d'hexadim  thrine, H9268, Sigma-Aldrich) est déposé sur les cellules, qui sont mises à l'incubateur, pendant 1 h. Par la suite, 9 mL de milieu de culture contenant aussi 4   g/mL de polybrène est ajouté sur les cellules, qui seront remises à l'incubateur pendant 2 jours. Finalement, pour sélectionner les cellules qui ont intégré le plasmide, celles-ci sont mises en présence de l'antibiotique associé au gène de résistance codé par le plasmide. Pour les constructions pLKO-Tet-On, l'antibiotique utilisé est la

puromycine, à une concentration de 1 µg/mL pour les lignées HCT116 et HT-29 et de 2 µg/mL pour les SW-48.

#### *3.2.1.4 Traitements pharmacologiques et stimulations*

L'inhibiteur SCH772984 a été resuspendu dans du DMSO à une concentration stock qui sera gardée à -20 °C. Pour obtenir une concentration expérimentale désirée, le stock est dilué dans une quantité appropriée de DMSO. Cette solution d'inhibiteur est directement ajoutée au milieu de culture des cellules à traiter : soit directement dans le puits lorsque celles-ci sont préalablement privées en sérum ou soit dans un récipient contenant le milieu de culture qui est par la suite distribué aux cellules. Une concentration finale de 1 µM a généralement été utilisée pour le SCH772984. Une condition contrôle est toujours utilisée en parallèle des traitements pharmacologiques et correspond au DMSO seul. L'EGF a été resuspendu à une concentration stock de 500 µg/ml dans du PBS BSA 0,1% stérile qui sera gardée à -80 °C. Une concentration finale de 100 ng/ml a été choisie pour les traitements. Les cellules sont privées 48 h en sérum avant stimulation avec du milieu non supplémenté contenant l'EGF 100 ng/ml.

#### *3.2.1.5 Transfection de siARN*

Les deux siARN ciblant LRP6 (siLRP6 #1 ; 5'-CCGCATGGTGATTGATGAA-3' et siLRP6 #2 ; 5'-CCGATGCAATGGAGATGCAAA-3') ainsi que le siARN contrôle (siCTRL ; SR30004, OriGene Technologies) ont été utilisés à des concentrations de 20 ou 50 nM. Les transfections ont été faites dans des pétris de 100 mm à l'aide du kit JetPrime® (114-07, Polyplus transfection, Illkirch-Graffenstaden, France) lorsque les cellules avaient atteint environ 70% de confluence. Les siARN sont mélangés avec 500 µL de JetPrime Buffer et 20 µL de JetPrime reagent. La solution est ensuite incubée pendant 10 minutes à température pièce et ajoutée goutte à goutte dans le milieu de culture des cellules pour 48 heures (sauf lorsqu'indiqué autrement).



### 3.2.1.6 Lyse cellulaire

Les cellules sont mises sur glace avant d'être rincées deux fois au PBS pour enlever toute trace de milieu de culture et de sérum puis lysées dans du tampon Triton (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 50 mM fluorure de sodium, 200  $\mu$ M orthovanadate, 5% glycérol, 1 mM d'aprotinine, de leupeptine, de pepstatine et de PMSF). Les lysats sont ensuite soniqués à 20% d'amplitude pendant 20 s (Sonic Dismembrator Ultrasonic Processor, Fisher Scientific) avant d'être centrifugés à 4 °C pendant 15 min. Finalement le surnageant, qui contient les protéines, est mis dans un nouveau tube qui sera conservé à -20 °C.

### 3.2.2 Immunobuvardage

Les échantillons protéiques sont dosés à l'aide de la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) tel que décrit par Smith *et al.* (1985) avant d'être dilué dans du Laemmli 4X (2-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,005%, glycérol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 63 mM, pH 6.8). Environ 20 à 40  $\mu$ g de ces protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrlamide Gel Electrophoresis) pendant environ 90 min à 120 V. Une fois séparées, les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF, 1620177, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) dans du tampon de transfert pH 8.3 (25 mM Tris-Base, 200 mM glycine) pendant 16 h et 30 min à 110 mA et 4 °C. Les protéines se trouvant sur la membrane sont ensuite colorées au rouge Ponceau. La membrane est ensuite incubée (« bloquée ») avec du tampon de lait en poudre 5% et du PBS Tween (0,05%) pendant 30 min à température pièce. Par la suite, la membrane est incubée dans une solution d'anticorps diluée dans ce tampon de lait en poudre, avec agitation, pendant environ 16 h à 4 °C. La membrane est lavée trois fois pendant 10 min dans du tampon PBS Tween (0,05%) avant d'y appliquer une solution d'anticorps secondaires, qui sont couplés à la HRP pendant 1 h à la température pièce. La membrane est lavée deux fois pendant 10 min dans du tampon PBS Tween (0,05%) et une autre fois dans du tampon PBS. Pour révéler le signal chimiluminescent, une solution ECL (« Enhanced ChemiLuminescence ») (90 mM d'acide *p*-coumarique (C9008, Sigma-Aldrich), 250 mM de luminol (A8511, Sigma-Aldrich), 0,03% de peroxyde d'hydrogène (216763, Sigma-Aldrich)) est appliquée sur la membrane pendant environ 1 min. La détection du signal se fait par autoradiographie.

### 3.2.3 Génération des constructions Tet-pLKO-puro shLRP6

Le vecteur Tet-pLKO-puro est un cadeau de Dimitri Wiederschain (Addgene plasmid #21915; [http://n2t.net/addgene:21915;RRID:Addgene\\_21915](http://n2t.net/addgene:21915;RRID:Addgene_21915), Waltertown, MA, USA) et le vecteur Tet-pLKO-puro shCTRL est un cadeau du professeur François Boudreau (Université de Sherbrooke). Il encode un shARN dont la séquence nucléotidique ne complémente, en théorie, aucun ARN messenger présent dans les cellules humaines. La séquence nucléotidique (5'-GGTGTACTGTCTCGGAAGTAAAT-3') du shARN ciblant l'ARNm de la protéine LRP6 a été déterminée à l'aide de la « Genetic Perturbation Platform » du Broad Institute du Massachusetts Institute of Technology (MIT). La séquence 5'-CTCGAG-3' a servi de boucle. Les oligonucléotides contenant les sites de restriction enzymatiques compatibles au vecteur Tet-pLKO-puro, la séquence du shARN ciblant l'ARNm de LRP6 et la boucle ont été achetés de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). Les oligonucléotides ont été hybridés pour former un ADN double brin pour ensuite être sous-clonés dans le vecteur Tet-pLKO-puro entre les sites de restriction AgeI et EcoRI.

### 3.2.4 Induction de l'expression des shARN inducibles

Le promoteur en aval de la séquence des shARNs se trouvant dans le vecteur Tet-pLKO-puro est actif seulement lorsque ses éléments de transactivation y sont liés. Pour s'y lier, ses derniers doivent être aussi liés à une molécule de doxycycline. L'expression des shARNs se fera donc seulement qu'en présence de doxycycline. La doxycycline est resuspendue dans de l'eau à une concentration stock de 10 mg/ml qui sera gardée à -20 °C. Des aliquots, à une concentration de 100 µg/ml, sont générés via dilution du stock avec de l'eau. Pour induire l'expression des shARNs, on dilue la doxycycline, à une concentration finale de 50 ng/ml, dans du milieu de culture. L'expression protéique de LRP6 est considérée diminuée au maximum de la capacité du système inductible 48 h après l'ajout de la doxycycline. À ce moment les cellules pourront être traitées ou réensemencées, selon l'expérience en cours.

### 3.2.5 Essais cellulaires

Avant chacun des essais cellulaires, les populations cellulaires HCT116, HT-29 et SW-48 stables pour l'expression inductible de shLRP6 ou shCTRL sont ensemencées dans deux

pétris de 10 cm de diamètre. Le lendemain, l'expression des shARN est induite en changeant le milieu de culture d'un des deux pétris par du milieu contenant 50 ng/ml de doxycycline. Dans l'autre pétri, le milieu de culture est seulement changé par du milieu frais. Cette condition servira de contrôle. Après 48 h, les cellules sont rincées une fois au PBS stérile et 1 mL de trypsine est ajouté au pétri qui est remis dans l'incubateur 37 °C 5% CO<sub>2</sub> pendant 8 min. Par la suite, la trypsine est inhibée par l'ajout de milieu de culture contenant du sérum fœtal bovin et la concentration cellulaire de chaque condition est déterminée par comptage de cellules sur hématimètre.

#### *3.2.5.1 Croissance en indépendance d'ancrage*

Pour évaluer la capacité des cellules à croître en indépendance d'ancrage, elles sontensemencées dans des plaques de 6 puits contenant de l'agarose mou 0,7% et du milieu de culture approprié pour chaque lignée. Une première couche d'agarose mou de 1,5 mL est coulée dans les puits pour empêcher tout contact entre les cellules et le fond de ces puits. Une fois que l'agarose est figé, une deuxième couche est coulée, mais contenant cette fois-ci 7500 cellules par puit pour les HCT116 et 30 000 pour les HT-29 et SW-48. Finalement, 1 mL de milieu de culture contenant de la doxycycline 50 ng/mL, qui sera changé tous les deux jours, est ajouté à chaque puits. Après 14 à 21 jours de culture, les colonies vivantes sont colorées par incorporation de MTT (0,5 mg/ml). Les puits sont photographiés et les colonies sont dénombrées à l'aide du module d'extension « Analyze Particles » du logiciel ImageJ.

#### *3.2.5.2 Essais clonogéniques*

Les essais clonogéniques évaluent la capacité des cellules individuelles à survivre et proliférer pour former des colonies. Pour se faire, un très petit nombre de cellules (1000 cellules) estensemencé dans un puits de plaques de 6 puits dans du milieu de culture approprié pour chaque lignée, tel que décrit dans la section 3.2.1.1. Le milieu de culture contenant de la doxycycline 50 ng/mL est changé tous les deux jours. Après 14 à 21 jours de culture, le milieu de culture est retiré et les colonies sont colorées à l'aide d'une solution de crystal violet pendant 20 min (crystal violet 0,05%, formaldéhyde 1% et méthanol 1% dans

du tampon PBS). Les plaques sont imagées au microscope Zeiss Cell Discoverer 7 (Plan-Apochromat 5x/0.35 ; 0.5x) et les colonies sont dénombrées manuellement.

#### *3.2.5.3 Incorporation de MTT*

Les cellules sontensemencées à raison de 7500 cellules par puits de plaque de 12 puits pour les HCT 116 et 10 000 par puits de plaque 12 puits pour les HT-29 et les SW-48. Le milieu de culture contenant de la doxycycline 50 ng/mL est changé tous les deux jours, sauf dans le cas où un inhibiteur est utilisé. Dans un tel cas, le milieu est changé tous les jours. L'incorporation de MTT se fait par l'incubation de milieu de culture contenant 0,5 mg/ml de MTT pendant 45 min à 37 °C et 5% CO<sub>2</sub>. Une fois métabolisé, le MTT est transformé en formazan qui a une couleur violette. Le milieu de culture est retiré et le formazan est solubilisé par l'ajout de DMSO. Le formazan est ensuite dosé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 562 nm.

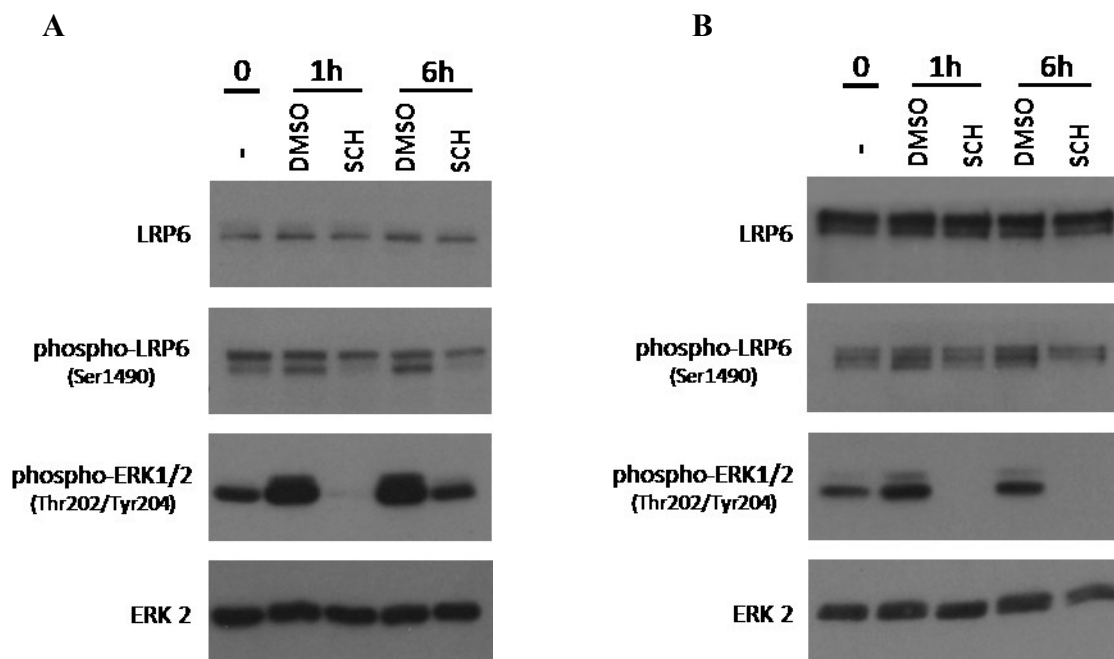
### **3.3 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 8 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). Un test de Student a été fait pour déterminer la significativité des résultats obtenus des tests réalisés sur les cellules. Les différences sont considérées comme étant significatives lorsque l'erreur était :  $p \leq 0,05$  (\*);  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) et  $p \leq 0,0001$ . La barre d'erreur représente l'écart-type de la moyenne.

## 4. Résultats

### 4.1 La phosphorylation de LRP6 est dépendante de la signalisation RAS/RAF/MEK/ERK dans des cellules cancéreuses colorectales portant des mutations activatrices pour *KRAS* ou *BRAF*.

Avant de caractériser le rôle de LRP6 dans les cellules cancéreuses colorectales, j'ai d'abord voulu caractériser la régulation de ses phosphorylations activatrices au niveau de sa queue cytoplasmique. Comme discuté dans l'introduction, plusieurs évidences suggéraient que les MAPK, notamment ERK1 et ERK2, peuvent induire la phosphorylation de LRP6. Pour vérifier si ce mécanisme de régulation est présent dans des lignées CRC déjà établies, les lignées Caco-2/15, HCT116, HT-29 et SW-48 en phase asynchrone de croissance ont été traitées avec un inhibiteur spécifique des kinases ERK1/2, le SCH772984 (SCH). Tout d'abord, on peut voir, par immunobuvardage, que le SCH inhibe bel et bien l'activité ERK1/2 tel que visualisée par la diminution des phosphorylations activatrices sur les résidus Thr202 et Tyr204 comparativement à la condition contrôle (DMSO) (Figures 1 et 2). Pour l'analyse de la phosphorylation de LRP6, nous avons choisi de mesurer la phosphorylation de la sérine 1490, un des résidus dont la phosphorylation est connue pour être associée à l'activation de LRP6 (Červenka *et al.*, 2011). De manière intéressante, la phosphorylation de LRP6 sur la sérine 1490 est fortement et rapidement diminuée après traitement au SCH, comparativement au contrôle, dans les lignées cellulaires qui portent des mutations activatrices pour *KRAS* ou *BRAF* (mutation *KRAS*<sup>G12V</sup> pour HCT116 et *BRAF*<sup>V600E</sup> pour HT-29) (Figure 1). Cependant, la phosphorylation de LRP6 au sein des lignées Caco-2/15 et SW-48, qui sont sauvages pour *KRAS* ou *BRAF* (que j'identifierai WT pour la suite) est très peu modulée suite au traitement avec le SCH comparativement à la condition contrôle (Figure 2).

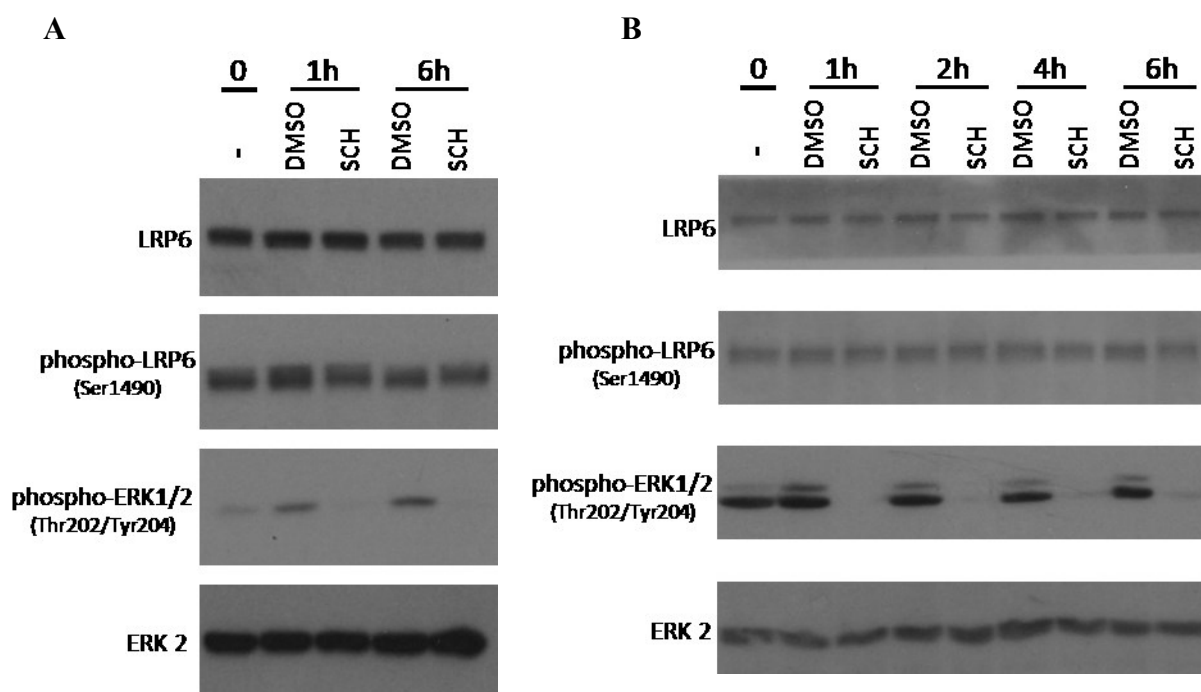


**Figure 1: L'inhibition pharmacologique de ERK1/2 par le SCH772984 diminue la phosphorylation de LRP6 chez les cellules cancéreuses colorectales portant des mutations activatrices pour *KRAS* ou *BRAF*.**

Les cellules HCT116 (A) et HT-29 (B) en phase exponentielle de croissance ont été traitées pendant 1 h et 6 h au DMSO ou au SCH772984 1  $\mu$ M dans du milieu frais pour inhiber les kinases ERK1/2. Les cellules ont été par la suite lysées et les lysats analysés par immunobuvardage pour l'expression de LRP6, de sa forme phosphorylée (Ser1490), de la forme totale de ERK2 et des formes phosphorylées de ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Expérience représentative de N=3.

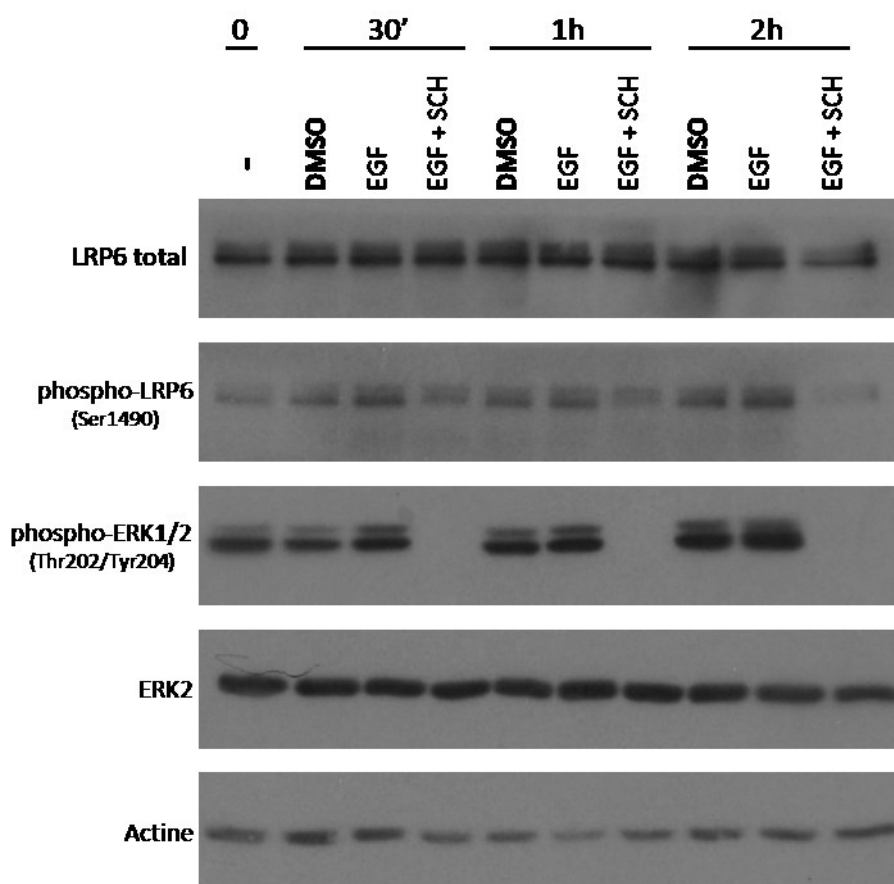
Nous avons voulu par la suite vérifier si la phosphorylation de LRP6 pouvait être modulée par l'ajout d'un facteur de croissance capable d'induire rapidement la voie RAS/RAF/MEK/ERK. Nous avons donc stimulé des cellules HCT116 à l'EGF recombinant en combinaison, ou non, avec le SCH afin d'évaluer si la phosphorylation de LRP6 pouvait être induite par l'EGF et si cette activation était spécifique aux kinases ERK1/2. Ainsi, il est possible de constater que LRP6 semble rapidement phosphorylé sur la sérine 1490 par l'EGF

après 30 min, 1 h et 2 h. De manière intéressante, cette augmentation de la phosphorylation semble dépendante de l'activation des kinases ERK1/2 puisqu'elle est réduite au niveau contrôle suite à l'addition de SCH (Figure 3).



**Figure 2: L'inhibition pharmacologique de ERK1/2 par le SCH772984 affecte peu la phosphorylation de LRP6 des cellules cancéreuses sauvages pour *KRAS* ou *BRAF*.**

Les cellules Caco-2/15 (A) et SW-48 (B) en phase exponentielle de croissance ont été traitées pendant 1 h et 6 h (A) ou pendant 1 h, 2 h, 4 h et 6 h (B) au DMSO ou au SCH772984 1  $\mu$ M dans du milieu frais pour inhiber les kinases ERK1/2. Les cellules ont été par la suite lysées et les lysats analysés par immunobuvardage pour l'expression de LRP6, de sa forme phosphorylée (Ser1490), de la forme totale ERK2 et des formes phosphorylées de ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Expérience représentative de N=3.



**Figure 3: L'EGF semble stimuler la phosphorylation rapide de LRP6 dans des cellules cancéreuses colorectales humaines.**

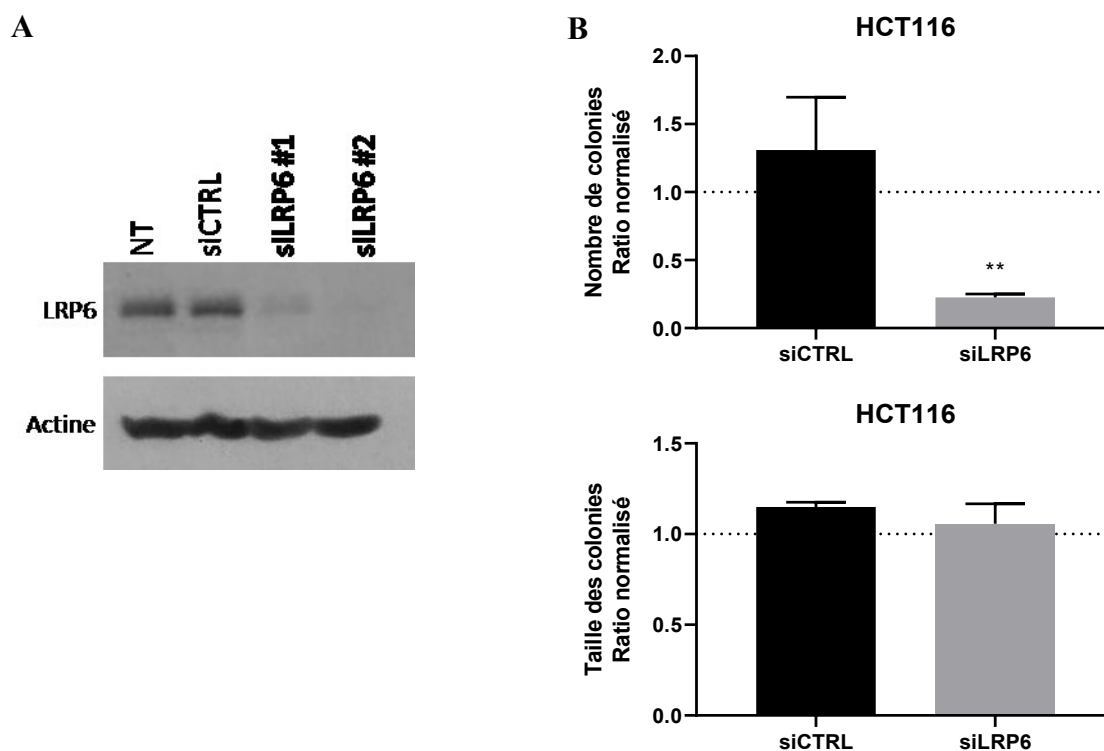
Les cellules HCT116 ont préalablement été privées en sérum pendant 48 h puis traitées pendant 30 min, 1 h ou 2 h au DMSO ou à l'EGF (100 ng/ml) en combinaison, ou non, avec le SCH772984 1  $\mu$ M. Les cellules ont été lysées et les lysats analysés par immunobuvardage de LRP6, de sa forme phosphorylée (Ser1490), de la forme totale de ERK2 et des formes phosphorylées de ERK1/2 (Thr202/Tyr204). La  $\beta$ -actine a servi de contrôle de dépôt interne. Expérience représentative de N=3.



## 4.2 L'expression de LRP6 semble être nécessaire pour la croissance des cellules cancéreuses colorectales humaines HCT116.

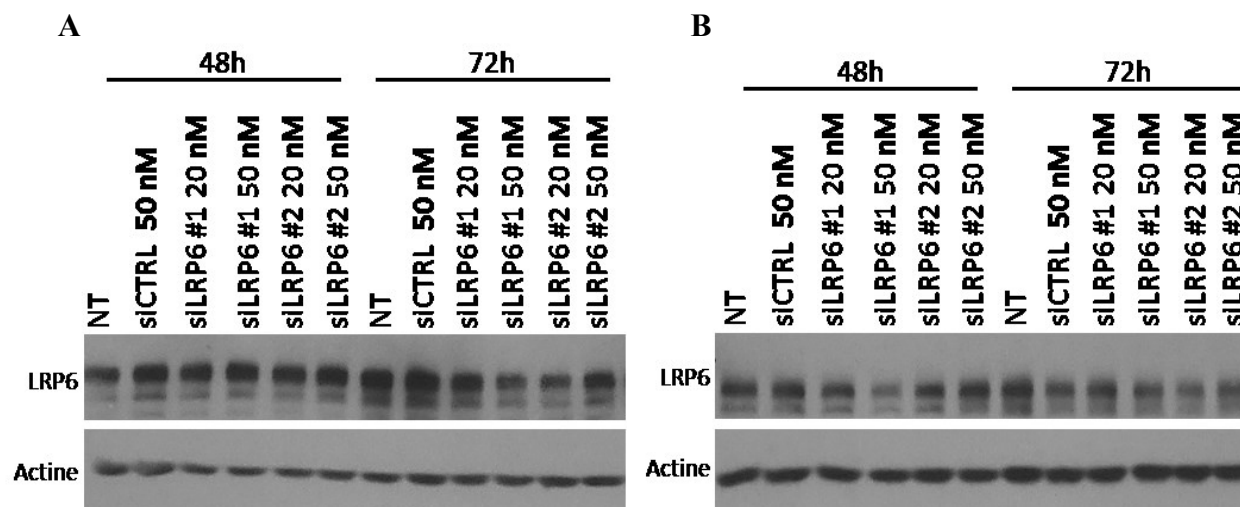
Comme la phosphorylation de LRP6 est régulée par l'activité des kinases ERK1 et ERK2 dans les cellules HCT116, il devenait intéressant et pertinent d'évaluer la contribution de LRP6 dans le potentiel de croissance de ces cellules. Pour ce faire, nous avons d'abord généré des siARN, à partir de séquences trouvées dans la littérature, dirigés contre l'ARNm de LRP6 afin d'en diminuer son expression. L'efficacité de deux siARN générés a préalablement été testée dans les cellules HCT116 afin d'utiliser celui qui résulte en la plus grande diminution de l'expression de LRP6 par rapport au siCTRL (Figure 4A). Par la suite, le siARN #2 ainsi qu'un siARN contrôle ont été utilisés pour analyser l'impact de la baisse d'expression de LRP6 sur la capacité des cellules HCT116 à croître en indépendance d'ancrage (ensemencement en agarose mou). Tel qu'illustré à la Figure 4B, nous avons observé que la diminution d'expression de LRP6 diminue fortement le nombre de colonies formées en agarose mou par rapport à la condition contrôle. Par contre, la taille des colonies formées ne semble pas affectée par la baisse d'expression de LRP6.

Nous avons voulu par la suite tester l'impact du siARN le plus efficace (siARN #2) sur la capacité à croître en indépendance d'ancrage d'autres lignées cancéreuses telles que les HT-29 et SW-48. Cependant, comme le montre la Figure 5, les transfections de ces deux lignées avec les mêmes siARN ne résultaient pas en une diminution significative et reproductible de l'expression de LRP6 lorsque comparées à la condition siCTRL. Après plusieurs essais de transfections et de tentatives d'optimisation de la technique, le manque de reproductibilité nous a forcés à abandonner l'utilisation de ces siARN pour étudier l'impact de l'inactivation de LRP6 dans les différentes cellules cancéreuses colorectales.



**Figure 4: La baisse d'expression de LRP6 diminue fortement la capacité des cellules HCT116 à croître en indépendance d'ancrage.**

**A.** Les cellules HCT116 ont été transfectées ou non (NT), avec un siARN contrôle (siCTRL) ou deux siARN dirigés contre LRP6 à 20 nM. Après 48 h, les cellules ont été lysées pour vérifier l'expression de LRP6 par immunobuvardage. L'immunobuvardage contre la  $\beta$ -actine a servi de contrôle de dépôt interne. **B.** Les cellules HCT116 ont été transfectées avec le siLRP6#2 à une concentration de 20 nM puisensemencées dans de l'agarose mou 48 h après. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Après 10 jours de culture, les colonies ont été colorées avec du MTT et analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Le ratio affiché représente le nombre de colonies formées, ou leur taille, dans une condition donnée, normalisé par rapport au nombre de colonies formées dans la condition non transfectée. Ainsi, un ratio  $<1$  représente une diminution du nombre de colonies formées, ou de leur taille, par rapport à la condition non transfectée. Le graphique présente les moyennes et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. Student's t-test  $N=3$ . \*\*  $p \leq 0.01$ .



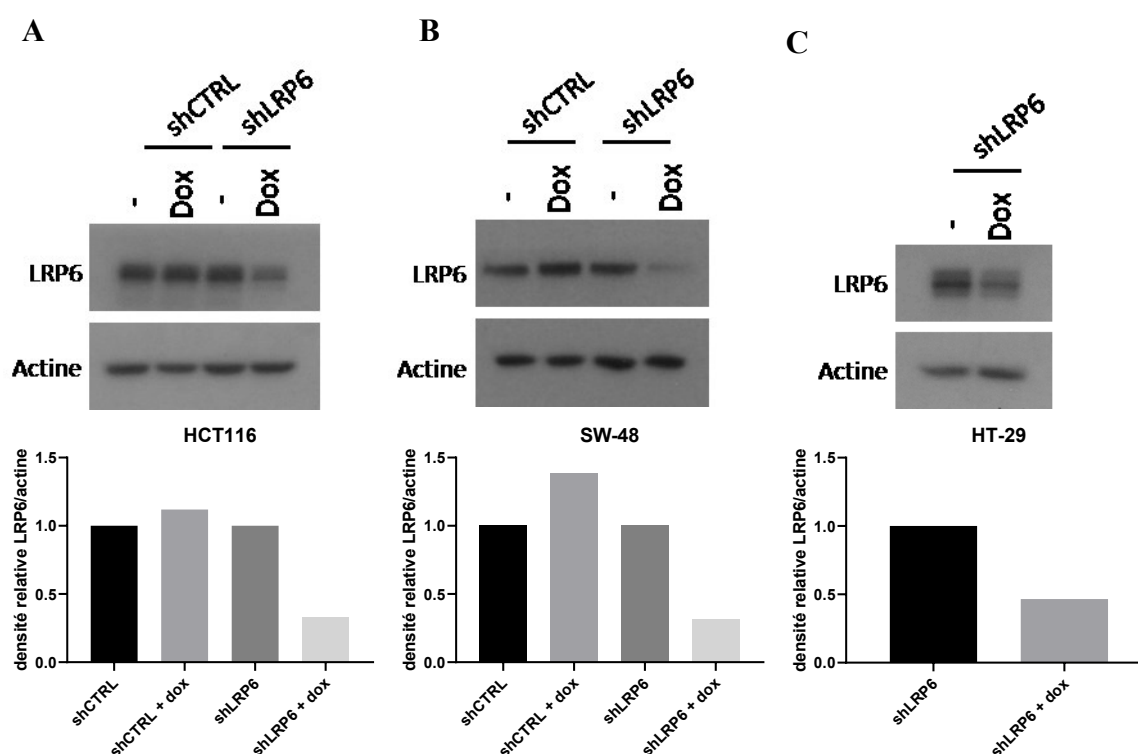
**Figure 5: Évaluation de l'efficacité des ARN interférants dirigés contre l'ARN messager de LRP6.**

Les lignées HT29 (A) et SW-48 (B) ont été transfectées avec les siRNAs (siCTRL, siLRP6 #1 et siLRP6 #2) par la méthode jetPRIME et ce, à des concentrations de 20 et 50 nM. Après 48 h et 72 h, les cellules ont été lysées pour une analyse par immunobuvardage de l'expression de LRP6 et de la  $\beta$ -actine, qui sert de contrôle de dépôt interne. CTRL : contrôle.

#### 4.3 Validation d'un système de baisse d'expression inducible de LRP6

Pour remédier aux problèmes de reproductibilité dans la baisse d'expression de LRP6 par siARN dans les différentes lignées cancéreuses, nous avons décidé de développer un modèle d'expression stable de shARN inductibles à la doxycycline. Tout d'abord, les lignées cellulaires HCT116, HT-29 et SW-48 ont été infectées avec des lentivirus exprimant soit un shARN dirigé contre l'ARN messager de LRP6 (shLRP6) ou un shARN ne reconnaissant théoriquement aucune cible (shCTRL). Les populations stables ont ensuite été générées par une sélection antibiotique. Enfin, le modèle a été validé par un traitement à la doxycycline et l'expression de LRP6 a été évaluée par immunobuvardage. Ainsi, nous avons bien observé une diminution importante de l'expression de LRP6 dans les cellules traitées à la doxycycline par rapport aux conditions non-traitées (NT) et shCTRL traitées à la doxycycline (Figure 6). L'analyse par densitométrie montre des baisses significatives de 67% dans les HCT116, de

69% dans les SW48 et de 54% dans les HT-29 lorsque comparées à la condition sans doxycycline. Malheureusement, la population de cellules HT-29 exprimant le shCTRL n'a pas résisté à la sélection et, dû à la fermeture des laboratoires de recherche de mars et avril, je n'ai pas pu relancer ces expériences.

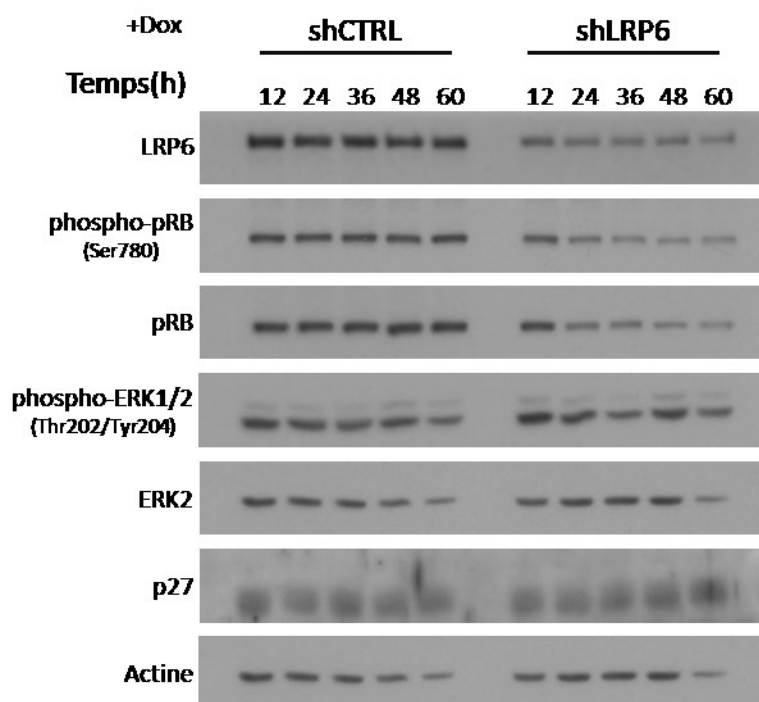


**Figure 6: Validation d'un modèle d'expression stable de shARN inductibles dirigés contre LRP6**

Les cellules HCT116 (A), SW-48 (B) et HT-29 (C) ont été infectées avec des lentivirus exprimant un shARN contrôle (shCTRL) ou un shARN inductible dirigé contre LRP6 (shLRP6). Après sélection antibiotique, les populations cellulaires ont été expansionnées puis analysées pour l'expression de LRP6 par immunobuvardage. Les populations ont été traitées à la doxycycline (50 ng/ml) pendant 48 h. L'immunobuvardage contre la  $\beta$ -actine a servi de contrôle de dépôt interne. La densitométrie de LRP6 a aussi été mesurée, à l'aide d'ImageJ, par rapport à l'actine, et est représentée sur les graphiques. Dox : doxycycline.

#### 4.4 Impact de la baisse d'expression de LRP6 sur l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules cancéreuses HCT116.

Je me suis alors intéressé à vérifier l'impact de la baisse de LRP6 sur l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Pour cela, j'ai utilisé les populations de cellules HCT116, puisque nos résultats avec les siARN suggéraient une contribution importante de LRP6 dans la capacité de croître en indépendance d'ancrage de ces cellules (section 4.2). Les populations HCT116 exprimant de manière stable le shLRP6 inductible ou shCTRL en phase exponentielle de croissance ont été traitées pendant 12, 24, 36, 48 et 60 h à la doxycycline (Figure 7). Tout d'abord, l'analyse par immunobuvardage démontre une baisse graduelle des niveaux de LRP6 et ce, dès 12 h après l'addition de doxycycline dans les populations shLRP6. J'ai alors analysé en parallèle le niveau de phosphorylation de ERK1/2, important pour la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses (McCubrey *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2019). Aucune différence notable a été observée entre les populations shCTRL et shLRP6, suite à l'addition de doxycycline. J'ai voulu néanmoins vérifier l'impact de la baisse de LRP6 sur la progression du cycle cellulaire. Pour cela, j'ai analysé le niveau de la phosphorylation (Ser 780) de la protéine du rétinoblastome (pRB), marqueur de la transition G1/S du cycle cellulaire. De manière surprenante, j'ai observé non seulement une baisse du niveau de phosphorylation de pRB, mais également de la forme totale de pRB dans les cellules shLRP6 traitées à la doxycycline (Figure 7). De plus, même si l'immunobuvardage de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 n'est pas très clair, celui-ci semble suggérer que l'expression de p27 augmente en parallèle avec la baisse d'expression de LRP6, surtout après 48 h et 60 h. La modulation d'expression de pRB et de p27, deux régulateurs importants du cycle cellulaire, suggère peut-être un rôle pour LRP6 dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et donc de la prolifération des cellules cancéreuses colorectales.



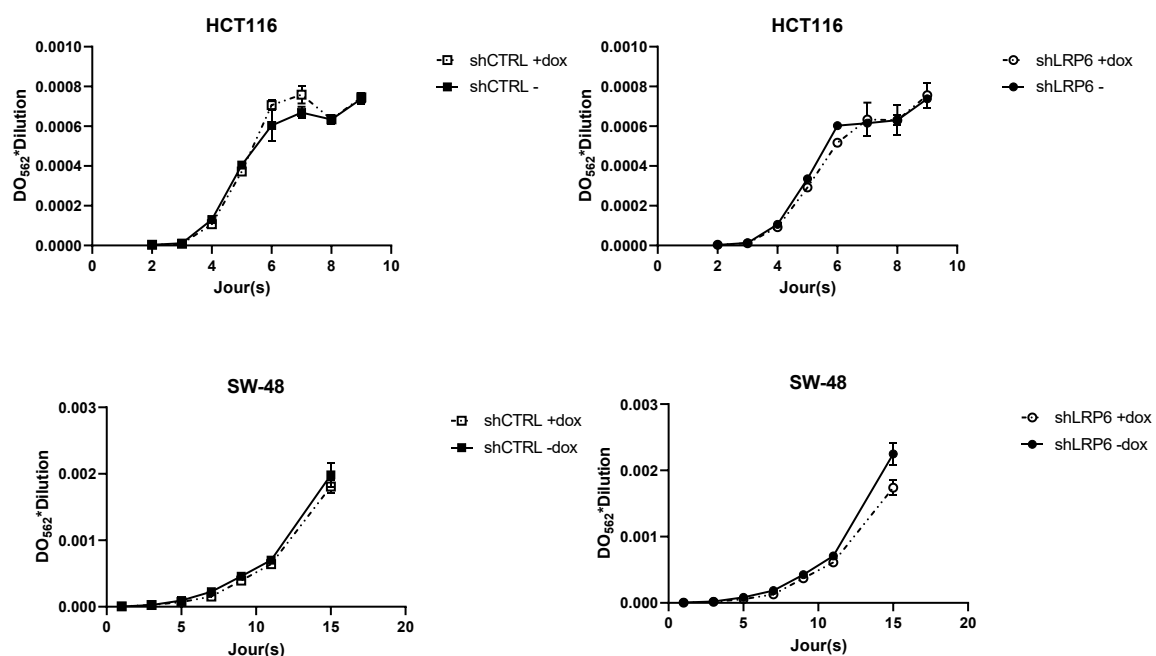
**Figure 7: Impact de la baisse d'expression de LRP6 sur certains marqueurs du cycle cellulaire.**

Les populations cellulaires shCTRL et shLRP6 en phase exponentielle de croissance ont été traitées pendant 12-60 h avec de la doxycycline. Par la suite, les cellules ont été lysées et les lysats analysés par immunobuvardage de différentes protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Les niveaux protéiques de LRP6, phospho-pRB (Ser780), pRB, phospho-ERK1/2 (Thyr202/Tyr204), ERK2, p27 et la  $\beta$ -actine ont été analysés.

#### 4.5 La baisse d'expression de LRP6 n'a pas d'impact significatif sur l'activité métabolique des cellules cancéreuses colorectales.

Pour mesurer le rôle de LRP6 dans la capacité proliférative des différentes lignées cellulaires, j'ai dans un premier temps utilisé la technique d'incorporation du MTT. Il est cependant important de se rappeler que ce test mesure l'activité métabolique des cellules, laquelle est proportionnelle à l'activité proliférative des cellules. Une fois métabolisé, le MTT devient du formazan, une molécule pouvant être dosée par colorimétrie. Comme nous pouvons voir

à la Figure 8, l'induction de l'expression du shLRP6 par la doxycycline n'influence pas la capacité des cellules HCT116 à incorporer le MTT comparativement aux cellules shLRP6 non-induites à la doxycycline. Aucun effet de la doxycycline n'a été aussi observé dans les populations shCTRL (Figure 8). Des résultats préliminaires obtenus dans les populations de HT-29, non montrés ici, suggèrent aussi que la baisse d'expression de LRP6 n'influence pas non plus leur capacité d'incorporer le MTT. Des expériences similaires ont été aussi réalisées dans les populations de SW-48 (WT pour *KRAS* et *BRAF*). Encore là, aucun effet de la doxycycline n'a été observé sur l'incorporation de MTT (Figure 8).



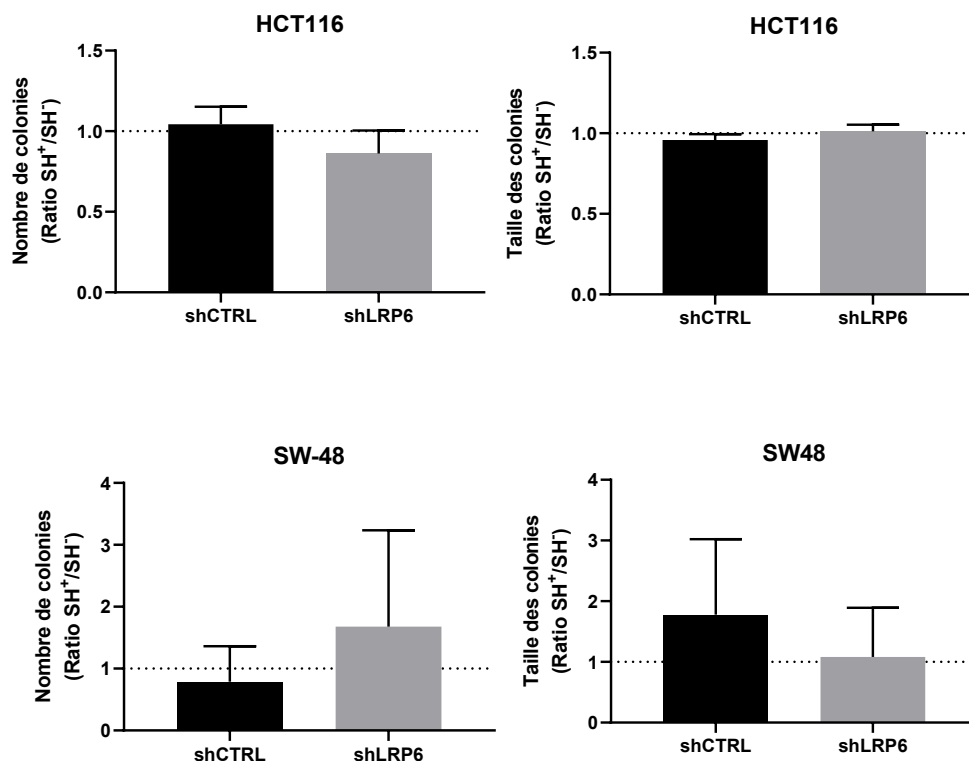
**Figure 8: La baisse d'expression de LRP6 n'influence pas l'activité métabolique des cellules cancéreuses colorectales.**

L'expression des shARN des populations shCTRL ou shLRP6 issues des lignées HCT116 et SW-48 a été induite à la doxycycline (50 ng/ml) pendant 48 h. L'incorporation de MTT a été par la suite évaluée chaque jour. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais contenant 50 ng/ml de MTT tous les 2 jours. Les graphiques représentent des expériences représentatives de N=3. Les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne des répliques techniques. Dox; doxycycline.

#### 4.6 La baisse d'expression de LRP6 n'a pas d'impact significatif sur la capacité de croissance en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales.

Pour évaluer le rôle de LRP6 sur la capacité des cellules à croître en indépendance d'ancrage, les populations shCTRL et shLRP6 ont été d'abord stimulées par de la doxycycline puis ensemencées dans de l'agarose mou. Après 10 jours pour les HCT116 et 21 jours pour les SW-48, les colonies ont été comptées. Comme le montre la Figure 9, le traitement à la doxycycline n'influence pas la capacité des cellules HCT116 à croître en indépendance d'ancrage. En effet, il n'y a aucune différence significative sur le nombre de colonies formées, ou sur leur taille, suite à l'addition de doxycycline qui réduit l'expression de LRP6 dans les populations shLRP6. Il est à noter que ces résultats contredisent en quelque sorte les résultats présentés à la Figure 4 et qui montraient que l'expression de siARN dirigé contre LRP6 diminue significativement la croissance en agar mou des HCT116. Je reviendrai là-dessus dans la discussion. Concernant les HT-29, des résultats similaires ont été obtenus avec les populations exprimant un shLRP6 inductible. Par exemple, le traitement à la doxycycline qui diminue l'expression de LRP6 n'influence pas non plus leur capacité de croître en indépendance d'ancrage (résultats non montrés). Finalement, j'ai aussi analysé la capacité de croître en agar mou des populations SW-48 et aucun effet de la doxycycline n'a été observé (Figure 9).



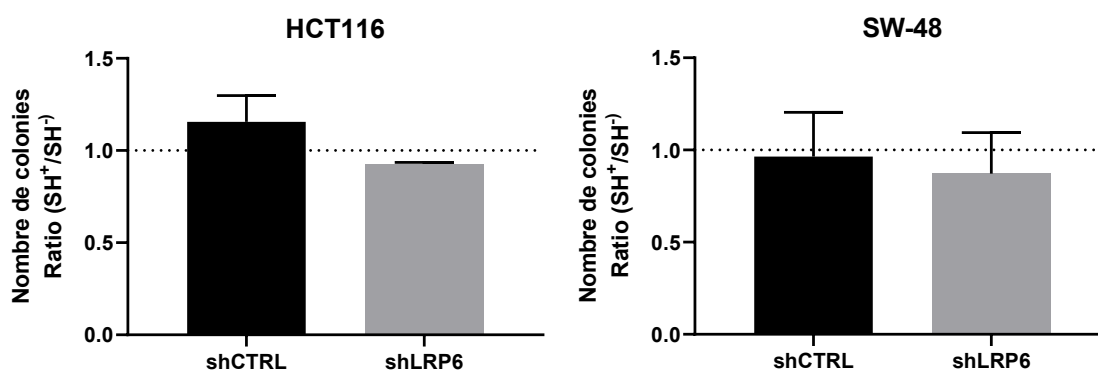


**Figure 9: La baisse d'expression de LRP6 n'influence pas la capacité à croître en indépendance d'ancrage des cellules cancéreuses colorectales.**

L'expression des shARN des populations shCTRL ou shLRP6 issues des lignées HCT116 et SW-48 a été induite à la doxycycline (50 ng/ml) pendant 48 h. Par la suite, les populations ont été ensemencées dans de l'agarose mou et après plusieurs jours en culture, les colonies ont été colorées avec du MTT et analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Le ratio affiché représente le nombre de colonies formées, ou leur taille, dans une condition donnée, normalisé par rapport au nombre de colonie formée dans la condition non-traitée à la doxycycline. Ainsi, un ratio <1 représente une diminution du nombre de colonies formées, ou de leur taille, par rapport à la condition non-induite à la doxycycline. Le graphique présente les moyennes et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. N=3.

#### 4.7 La baisse d'expression de LRP6 n'a pas d'impact significatif sur la survie clonogénique des cellules cancéreuses colorectales.

Finalement, pour mesurer le rôle de LRP6 sur la survie clonogénique des différentes lignées cancéreuses colorectales, j'ai effectué des essais clonogéniques. Fondamentalement, le test de survie clonogénique permet d'évaluer les différences de viabilité de reproduction (capacité des cellules à produire une descendance; c'est à dire une seule cellule pour former une colonie de 50 cellules). Comme on peut voir à la Figure 10, il n'y a aucune différence significative du nombre de colonies formées par les populations HCT116 exprimant shLRP6 par rapport à la condition contrôle suite au traitement à la doxycycline. Des expériences similaires effectuées dans les HT-29 suggèrent aussi que la baisse d'expression de LRP6 n'affecte pas leur survie clonogénique (données préliminaires). Finalement, aucun effet n'a été aussi remarqué dans les populations de SW-48 traitées à la doxycycline (Figure 10).



**Figure 10: La baisse d'expression de LRP6 n'influence pas la survie clonogénique de cellules colorectales cancéreuses.**

L'expression des shARN des populations shCTRL ou shLRP6 issues des lignées HCT116 et SW-48 a été induite à la doxycycline (50 ng/ml) pendant 48 h. Les cellules ont été par la suiteensemencées à très faible densité, de façon à ce que chaque cellule soit isolée. Après 14 jours en culture, les colonies ont été colorées avec du MTT et dénombrées à l'aide du logiciel ImageJ. Le ratio affiché représente le nombre de colonies formées, ou leur taille, dans une condition donnée, normalisé par rapport au nombre de colonie formée dans la condition non-traitée à la doxycycline. Ainsi, un ratio <1 représente une diminution du

nombre de colonies formées, ou de leur taille, par rapport à la condition non-induite à la doxycycline. Le graphique présente les moyennes et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. N=3.

## 5. Discussion

Le co-récepteur LRP6 est très important pour la signalisation cellulaire de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. En réponse à différents facteurs Wnt, il promeut le recrutement membranaire et l'inhibition du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine, permettant à celle-ci d'accomplir ses rôles transcriptionnels (Raisch *et al.*, 2019). Des travaux récents au sein de notre laboratoire ont suggéré que LRP6 agirait comme un point de convergence important entre les voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, la transformation de cellules épithéliales intestinales par des formes oncogéniques de *KRAS* ou *BRAF* a été associée à une augmentation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine ainsi qu'à une augmentation des phosphorylations activatrices, dépendantes des MAPK, de la queue cytoplasmique du co-récepteur LRP6 (Lemieux *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent une importance particulière de LRP6 et de ses phosphorylations dans la tumorigenèse intestinale.

### 5.1 La phosphorylation de LRP6 est différentiellement régulée dans les lignées cancéreuses colorectales portant des mutations activatrices pour *KRAS* ou *BRAF*

Notre groupe de recherche a montré que les phosphorylations activatrices sur la sérine 1490 et la thréonine 1572 étaient fortement augmentées dans les adénomes et adénocarcinomes colorectaux humains par rapport aux marges saines. (Lemieux *et al.*, 2015). Un autre groupe de recherche a aussi récemment montré que l'expression de la forme phosphorylée de LRP6 sur la sérine 1490 corrélait avec un comportement agressif des carcinomes colorectaux (Yao *et al.*, 2017). En effet, ils ont remarqué que l'expression de la forme phosphorylée de LRP6 (p-LRP6) corrélait linéairement avec les classifications TNM et Duke's. En d'autres mots, la phosphorylation de LRP6, du moins la phosphorylation sur son résidu sérine 1490, semble être plus présente dans les stades plus avancés de la progression tumorale. Ainsi, p-LRP6 a été détectée dans 80% des carcinomes avancés comparativement à 35,3% des carcinomes précoces. Phospho-LRP6 a aussi été détecté dans 76,6% des cas de cancers colorectaux présentant des métastases comparativement à 48,8% des cas qui ne présentaient pas de métastases. De plus, l'expression de la forme phosphorylée de LRP6 est augmentée dans les carcinomes (62,3%) par rapport aux adénomes (5,3%) et aux tissus normaux (4,8%). De

manière intéressante, les auteurs ont observé que l'expression de la forme phosphorylée de LRP6 corrélait aussi positivement avec la localisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. Finalement, ils ont rapporté que la détection de la forme phosphorylée de LRP6 était associée à une diminution de la survie des patients atteints de cancer colorectal sans récurrence (Yao *et al.*, 2017). Pris ensemble, les résultats de cette dernière étude ainsi que ceux rapportés par notre groupe (Lemieux *et al.*, 2015) suggèrent fortement que la phosphorylation et donc l'activation de LRP6 sont impliquées dans la progression tumorale colorectale.

Afin de mieux comprendre l'implication de la signalisation RAS/RAF/MEK/ERK sur la phosphorylation de LRP6, différentes lignées cancéreuses colorectales humaines bien établies ont été traitées avec un inhibiteur des kinases ERK1/2, le SCH772984. De manière intéressante, nous avons observé que les lignées cancéreuses colorectales HCT116 et HT-29 traitées au SCH présentaient une forte diminution de la phosphorylation de LRP6 et ce, dès 1 h de traitement, suggérant une action directe de ces kinases sur LRP6. Au contraire, la phosphorylation de LRP6 dans les lignées Caco-2/15 et SW-48 traitées au SCH n'était peu ou pas modulée. Pour essayer de comprendre ce différentiel au niveau de la régulation de la phosphorylation de LRP6, nous avons investigué le statut mutationnel des principaux effecteurs de la voie RAS/RAF/MEK/ERK. Ainsi, la lignée HCT116 porte la mutation activatrice *KRAS*<sup>G12V</sup> et la lignée HT-29, *BRAF*<sup>V600E</sup> tandis que les lignées Caco-2/15 et SW-48 ne portent pas de mutations pour ces deux effecteurs, qui, pour rappel, sont des oncogènes connus de la voie RAS/RAF/MEK/ERK et mutés dans plus de 60% des cas de CRC (Midthun *et al.*, 2019). Cette différence mutationnelle pourrait peut-être expliquer la différence de régulation de la phosphorylation de LRP6. En effet, il est possible qu'une activation non-régulée (autant pour sa temporalité que pour sa localisation) des kinases ERK1/2 dans les lignées mutées pour *KRAS* ou *BRAF* résulte en la phosphorylation constitutive et directe du récepteur LRP6. Pour tester directement cette hypothèse, on pourrait surexprimer la forme oncogénique de *KRAS* ou de *BRAF* dans une lignée sauvage pour ces deux gènes (par exemple Caco-2) et analyser l'impact concomitant sur la phosphorylation des ERK1/2 et de LRP6 ainsi que sur les propriétés tumorales des cellules. En effet, il a déjà été rapporté que l'expression de ces oncogènes accentue le caractère tumoral des Caco-2 notamment en augmentant leur prolifération, en causant la perte de leur polarité apico-basale et en

augmentant leurs capacités migratoires et invasives (Makrodouli *et al.*, 2011; Magudia *et al.*, 2012)

L'inhibition rapide de la phosphorylation de LRP6 par le traitement des cellules HCT116 et HT-29 avec le SCH suggérait une régulation directe par les kinases ERK1/2. Afin de vérifier cela, nous avons testé si l'activation rapide de ERK1/2 pouvait augmenter la phosphorylation de LRP6. Des cellules HCT116 ont donc été privées en sérum puis traitées avec de l'EGF, un facteur de croissance bien connu pour rapidement et fortement activer la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales (Frey *et al.*, 2004). Ainsi, une augmentation de la phosphorylation sur la sérine 1490 de LRP6 est observée après le traitement à l'EGF et ce, à 30 minutes. L'effet de l'EGF sur la phosphorylation de LRP6 à 1 et 2 heures de traitement est moins évidente qu'à 30 minutes, mais semble corrélérer avec le faible niveau d'activation des kinases ERK1/2 comparativement à la condition DMSO. Néanmoins, ces résultats renforcent l'hypothèse que le niveau de phosphorylation de LRP6 dans les cellules HCT116 et HT-29 puisse être régulé par le niveau d'activation des ERK1/2. En accord avec cette hypothèse, le groupe de Červenka *et al.* (2011) a déjà démontré dans un essai kinase *in vitro*, que ERK1 pouvait phosphoryler directement le domaine intracellulaire de LRP6 en présence d'ATP. Une caractéristique des protéines ERK1/2 est qu'elles possèdent une activité catalytique kinasique « proline dirigée » puisqu'elles phosphorylent seulement des résidus localisés à proximité de résidus proline (Cowan et Storey, 2003). Les motifs PPS/TP présents dans le domaine intracellulaire de LRP6 représentent donc de bonnes cibles potentielles pour les kinases ERK1/2. Il reste néanmoins plusieurs évidences *in cellulo* à fournir avant de pouvoir affirmer avec certitude que les kinases ERK1/2 sont capables de phosphoryler directement LRP6 et surtout que cette phosphorylation est suffisante pour activer en aval la signalisation telle que celle dépendante de la  $\beta$ -caténine.

## 5.2 La baisse d'expression du co-récepteur LRP6 a peu d'impact sur métabolisme, la croissance en indépendance d'ancrage et la survie clonogénique des cellules cancéreuses colorectales humaines, même celles mutées pour *KRAS* ou *BRAF*.

Nos résultats montrant que l'inhibition ou l'activation de la signalisation ERK1/2 module le niveau de phosphorylation de LRP6 dans les cellules cancéreuses mutées pour *KRAS* ou *BRAF* suggèrent fortement que cette phosphorylation doit être importante pour le signal oncogénique induit par *KRAS*<sup>G12V</sup> ou *BRAF*<sup>V600E</sup> et donc pour le maintien des propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales. En effet, rappelons que LRP6 joue un rôle crucial dans l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, une voie cruciale pour l'initiation et la progression de la carcinogénèse colorectale (Schatoff *et al.*, 2017). Nous avons donc voulu analyser le rôle de LRP6 dans des lignées de cellules cancéreuses colorectales bien établies en culture.

Pour caractériser le rôle de LRP6 dans les cellules cancéreuses colorectales, nous avons, dans un premier temps, décidé d'utiliser l'approche d'interférence par ARN complémentaires aux ARNm de LRP6 afin de réduire son expression protéique et observer l'impact sur la capacité des cellules HCT116 à croître en indépendance d'ancrage. La capacité de former des colonies en agarose mou est en fait une mesure de la capacité de cellules individuelles à survivre sans l'adhésion à leur matrice extracellulaire, qui fournit entre autres des signaux de survie aux cellules épithéliales pour éviter qu'elles meurent par anoïkose (Borowicz *et al.*, 2014). Cette capacité à croître en indépendance d'ancrage et de résistance à l'anoïkose est une caractéristique fréquente des cellules tumorales et cancéreuses. De manière intéressante, la baisse de l'expression de LRP6 par un siARN (voir résultats, siLRP6#2) a réduit très fortement la capacité des HCT116 à former des colonies en agarose mou, suggérant que l'expression de LRP6 est importante pour la formation de colonies en indépendance d'ancrage des cellules HCT116. Nous avons voulu évidemment répéter cette expérience dans d'autres lignées cancéreuses colorectales afin de vérifier si LRP6 y jouait également ce rôle très important pour leur croissance. Malheureusement, mes expériences de transfection n'ont pas été reproductibles. La baisse d'expression était très variable d'une expérience à l'autre pour une lignée et aussi d'une lignée à l'autre. Quelques hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette variabilité dans les résultats. Tout d'abord, contrairement à la lignée

HCT116, les lignées SW-48 et HT-29 sont reconnues comme étant des lignées très difficiles à transfecter avec efficacité (Observations non publiées du laboratoire). De plus, il est bien connu que lors d'une transfection, les cellules expriment le siARN différemment, et ce, dépendamment de l'efficacité de transfection. En effet, malgré leur efficacité *in vitro*, l'inconvénient majeur qui limite l'utilisation des siRNA consiste en une délivrance difficile en raison de leur très faible stabilité dans les fluides physiologiques et de leur perméabilité membranaire limitée à travers les barrières physiologiques. Les liposomes (bicouches lipidiques fermées dans des vésicules de différentes tailles) représentent généralement de bons systèmes d'administration, mais doivent être souvent adaptés afin d'obtenir les meilleures performances en termes de charge, de taille des vésicules et de rendement de transfection dans certains types cellulaires. Une autre façon de pallier ces problèmes de transfection transitoire est de plutôt utiliser un système de délivrance virale et de plutôt générer des populations stables.

Nous avons donc décidé d'utiliser un modèle d'expression stable de shARN inductibles à la doxycycline pour induire la diminution d'expression de LRP6 dans les lignées cancéreuses colorectales. Des populations stables des lignées HCT116, HT-29 et SW-48 ont donc été générées. L'ajout de doxycycline à ces populations stables diminue l'expression protéique de LRP6 de 54% à 69%, selon les lignées. J'ai débuté la caractérisation de l'impact de la diminution d'expression de LRP6 en analysant certains marqueurs de la progression du cycle cellulaire. Cette décision me semblait évidente, considérant les premiers résultats d'ARN interférence en indépendance d'ancrage, qui montraient que la perte de LRP6 dans les HCT116 réduisait leur capacité à former des colonies en agarose mou. Dans un premier temps, j'ai vérifié le niveau de phosphorylation et donc d'activation des kinases ERK1/2. Il est en effet bien connu que l'activation de ces kinases est nécessaire à la prolifération cellulaire de plusieurs lignées cancéreuses (Morris *et al.*, 2013; Bhagwat *et al.*, 2019). Tel que démontré à la Figure 7, le niveau d'activation des ERK1/2 n'est pas modulée de manière significative dans les cellules déficientes pour l'expression de LRP6. Un des marqueurs clés de la transition G1/S du cycle cellulaire est la phosphorylation de pRb. En effet, la phosphorylation de pRb par les complexes cycline D/Cdk4,6 et cycline E/Cdk2 libèrent les facteurs de transcription E2F, très importants pour induire la transcription de gènes



nécessaires à la réplication de l'ADN (Burkhart et Sage, 2008). Ainsi, j'ai constaté que la baisse d'expression de LRP6 induisait une diminution d'expression non seulement de la forme phosphorylée sur la sérine 780 de pRb, mais aussi de sa forme totale. Il est à noter que la diminution de la forme phosphorylée est probablement due à la diminution de la forme totale puisque les profils d'expression se suivent pendant tout le traitement à la doxycycline.

Cette baisse d'expression de la forme totale de pRb est particulièrement intrigante. Généralement, l'activité de cette protéine est régulée par sa phosphorylation plutôt que par son expression totale. Il existe en effet très peu de littérature concernant la régulation de son expression totale outre le fait que pRb contient un site de clivage pour les caspases dans sa région C-terminale, et que son clivage est induit lors de l'apoptose (Tan et Wang, 1998). Il se pourrait donc que la diminution de l'expression totale de pRb observée ici soit associée à une augmentation de l'activité de caspases, ce qui n'a malheureusement pas été analysée spécifiquement. Pour se faire, l'expression des différentes formes de caspase 3 et de son substrat, la PARP, auraient pu être vérifiées par immunobuvardage. Néanmoins, je n'ai pas observé d'augmentation de mortalité cellulaire (cellules qui flottent) lorsque mes populations étaient stimulées à la doxycycline, du moins dans les périodes de temps analysées.

Une autre observation intrigante que j'ai fait est l'augmentation de l'expression de la protéine p27 dans les cellules traitées à la doxycycline. La protéine p27 est bien connue pour son rôle inhibiteur du cycle cellulaire (Besson *et al.*, 2008). En effet, une forte expression de p27 est observée dans les cellules quiescentes (G0) et lorsque les cellules sont stimulées par les facteurs de croissance, l'expression de p27 diminue. En effet, l'activation des complexes cycline/Cdk, Cdk2 principalement, cause la phosphorylation de p27, ce qui le cible au protéasome pour dégradation (Montagnoli *et al.*, 1999). Ainsi, l'augmentation de son expression qu'on observe aux plus longs temps de traitement à la doxycycline pourrait suggérer un ralentissement du cycle cellulaire.

Afin de vérifier si la baisse de LRP6 affecte significativement le rythme de prolifération des cellules cancéreuses colorectales, j'ai d'abord mesuré leur activité métabolique par une analyse de l'incorporation du MTT. Tel qu'illustré à la Figure 8, je n'ai pas observé de

différence significative dans la capacité à incorporer le MTT chez les cellules HCT116 et SW-48 stimulées à la doxycycline. Afin de vraiment vérifier l'impact de la baisse de LRP6 sur la croissance des cellules cancéreuses, j'ai réalisé plusieurs essais de croissance en indépendance d'ancrage. Encore une fois, je n'ai malheureusement pas observé de différence significative sur le nombre de colonies formées en agar mou pour les HCT116 et SW-48 stimulées à la doxycycline (Figure 9). Des données préliminaires dans les HT-29 confirment aussi tous ces résultats.

Comme ultime tentative de vérifier le rôle de LRP6 dans la capacité proliférative des cellules cancéreuses, j'ai utilisé le test de survie clonogénique. Malheureusement, aucun effet significatif de la doxycycline n'a été observé sur la capacité des cellules cancéreuses colorectales, du moins HCT116 et SW-48, à survivre et à former des clones (Figure 10). De façon intéressante, ces résultats concordent bien avec des données non publiées du laboratoire, obtenues en parallèle de cette étude. En effet, la délétion épithéliale de LRP6 dans des souris *Apc<sup>min/+</sup>* (un modèle de tumorigenèse intestinale) n'a eu aucun effet sur le nombre de polypes formés comparativement aux souris contrôles. De plus, l'inactivation complète de LRP6 a été réalisée par le consortium DepMap dans plus de 700 lignées tumorales sans pour autant affecter leur capacité proliférative sur plastique.

### 5.3 Pourquoi la baisse d'expression de LRP6 n'altère pas les propriétés tumorales de cellules cancéreuses colorectales humaines?

Pris ensemble, mes résultats suggèrent fortement que l'expression de LRP6 n'est pas importante pour le maintien des propriétés tumorales des cellules colorectales cancéreuses, notamment HCT116, HT-29 et SW-48. Évidemment, les résultats obtenus suite à la baisse d'expression de LRP6 par shARN se sont révélés très surprenants et n'étaient pas ceux attendus, surtout pour les HCT116. En effet, mes premiers essais d'agarose mou avec les HCT116 (Figure 4) montraient que la baisse d'expression de LRP6 par siARN affectait significativement leur capacité de croître en indépendance d'ancrage. Ces différences de résultats lorsque l'expression de LRP6 est diminuée par siARN versus shARN pourraient s'expliquer par des efficacités différentes à réduire l'expression de LRP6. En effet, dans les

HCT116, j'ai observé que la baisse d'expression protéique de LRP6 était presque complète avec le siARN (>90%) alors qu'elle était toujours plus partielle avec le shARN. En effet, la baisse d'expression de LRP6 dans les populations exprimant le shARN inducible était d'environ 60-70% suite à l'addition de doxycycline, selon les expériences. Il est possible que le 30-40% d'expression restant soit suffisant pour que LRP6 puisse activer pleinement sa signalisation en aval et accomplir ses différentes fonctions cellulaires. De plus, il est aussi possible que le siARN utilisé dans les premières expériences n'était pas complètement spécifique à l'ARNm de LRP6, ce qui pourrait expliquer les différences de résultats de croissance en indépendance entre siARN versus shARN.

Au vu de tous les indices suggérant un rôle pour LRP6 dans la carcinogenèse colorectale, il est quand même très surprenant de constater que la perte d'expression de LRP6, même de 60-70%, par l'expression de shARN n'ait pas d'effet notable sur le métabolisme, la croissance et la survie clonogénique des lignées cancéreuses colorectales. Encore une fois, on peut avancer certaines hypothèses pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, les lignées HCT116, SW-48 et HT-29 portent toutes des mutations activatrices pour la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, les lignées HCT116 et SW-48 sont mutées pour *CTNNB1*, qui codent la  $\beta$ -caténine, tandis que les HT-29 sont mutées pour *APC* (Tate *et al.*, 2018). LRP6 se trouvant en amont des effecteurs APC et  $\beta$ -caténine, sa baisse n'est probablement pas suffisante pour avoir un impact sur la signalisation en aval, déjà activée. Cela dit, Saito-Diaz *et al.* (2018) a récemment démontré que LRP6 était requis pour l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les lignées cancéreuses colorectales portant des mutations pour *APC*, mais pas pour la  $\beta$ -caténine. Cette observation concorde bien avec tous les résultats négatifs obtenus dans les HCT116 et SW-48 qui sont mutées pour la  $\beta$ -caténine. Il aurait été souhaitable que je vérifie l'impact de la baisse d'expression de LRP6 sur l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les différentes lignées cellulaires afin de mieux comprendre l'absence d'effet sur le phénotype. Pour cela, j'aurais pu effectuer un essai luciférase en utilisant le gène rapporteur TOPflash. En effet, ce gène rapporteur contient dans le promoteur en amont de la luciférase les éléments de liaison pour les facteurs de transcription TCF/LEF, les partenaires d'hétérodimérisation de la  $\beta$ -caténine (Raisch *et al.*, 2019). Ce gène rapporteur est utilisé

fréquemment pour mesurer l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine et donc de la voie Wnt (Molenaar *et al.*, 1996; Clevers, 2006).

Une autre explication concerne le co-récepteur LRP5 qui pourrait agir de manière compensatoire après une diminution de l'expression de LRP6. LRP5 fait en effet partie de la même famille de récepteurs que LRP6, en plus d'avoir 71% d'homologie et de reconnaître certains mêmes ligands (Zhong *et al.*, 2012). Un groupe de recherche a justement démontré que LRP5 et LRP6 jouent des rôles compensatoires dans l'intestin de souris et que l'inactivation épithéliale du gène *Lrp6* n'était pas suffisante pour affecter le développement de l'épithélium intestinal (Zhong *et al.*, 2012). Ainsi, il pourrait être intéressant de vérifier les niveaux d'activation de LRP5 survenant après la diminution d'expression de LRP6 dans les HCT116, SW-48 et HT-29. Nous avons déjà essayé de vérifier la phosphorylation de LRP5 par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti phospho-LRP5 commercialement disponible. Malheureusement, la qualité de l'anticorps n'a pas permis de faire les analyses par immunobuvardage (résultats non montrés) et donc d'apporter des conclusions quant au niveau de phosphorylation de LRP5.

Finalement, il ne faut pas oublier que les lignées cellulaires utilisées sont des lignées issues d'adénocarcinomes de côlon, isolées de patients, très avancées dans le processus de carcinogenèse. Ces cellules présentent donc plusieurs altérations génétiques telles que des mutations non seulement dans les gènes *APC*, *BRAF* ou *KRAS* mais également dans d'autres gènes contrôlant aussi la survie et la progression du cycle cellulaire (*BAX*, *PI3KCA*, *TP53*), la morphologie (*TGFBR2*), la migration, la polarité et l'invasion (*SMAD4*, *PI3KCA*, *TGFBR2*), etc. Les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN sont également fréquemment touchés dans la carcinogenèse colique tels que *MLH 1* et *MSH 2* (et *hMSH6*). Un défaut du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) entraînera des mutations fréquentes dans des séquences répétées de nucléotides, appelées microsatellites. Bref, la présence de ces multiples altérations génétiques renforce certainement les capacités prolifératives et de survie de ces lignées cancéreuses colorectales. D'ailleurs, ces lignées présentent différentes résistances notamment à des agents chimiothérapeutiques (SW-48; Arnold *et al.*, 2009), à la radiation (HT-29; Lambin *et al.*, 1996; Khalaj *et al.*, 2006) ou à

différents agents pharmacologiques (HCT116 et HT-29; Troiani *et al.*, 2014). Il y a donc fort à parier que la baisse partielle d'expression de LRP6 dans ces lignées bien établies soit vraiment insuffisante pour affecter, même un peu, leurs propriétés tumorales.

#### 5.4 LRP6 : une cible quand même intéressante pour le traitement du cancer colorectal ?

Même si la majorité des résultats présentés précédemment ne démontrent pas un rôle pour LRP6 dans le maintien des propriétés tumorales de cellules cancéreuses colorectales, il existe tout de même plusieurs évidences de son importance dans la carcinogenèse colorectale soutenant que ce récepteur cellulaire pourrait être une cible intéressante pour traiter le cancer colorectal.

En effet, il faut tout d'abord rappeler que la protéine LRP6 est surexprimée dans la plupart des lignées cancéreuses colorectales en plus d'être surexprimée dans la majorité des tumeurs colorectales (61%) par rapport aux marges saines (Rismani *et al.*, 2017). L'antagoniste de LRP6, DKK1, ainsi que son répresseur transcriptionnel, *necdin*, ont tous les deux été montrés comme étant sous-exprimés dans le cancer colorectal (González-Sancho *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2017). Comme mentionné plus tôt, sa phosphorylation, qui démontre de son état d'activation, est aussi augmentée dans les tumeurs colorectales humaines par rapport aux marges saines (Lemieux *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2017). De plus, la présence de sa phosphorylation corrèle positivement avec la malignité et la stadification tumorale. Ces résultats suggèrent fortement que l'expression et l'activation de LRP6 contribuent à la progression du cancer colorectal.

En ce sens, il a récemment été démontré que la surexpression de LRP6, l'inverse de la stratégie employée dans la présente étude, et ce, dans les lignées cancéreuses colorectales HCT116 et LoVo induit l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, le remodelage de l'actine et des microtubules ainsi qu'une augmentation de la migration cellulaire (Yao *et al.*, 2017). Ji *et al.* (2019) ont aussi récemment démontré que la diminution de l'expression de LRP6 par l'expression du micro-ARN miR-195, réduisait l'activation de la signalisation de la  $\beta$ -

caténine, la formation de métastases chez la souris et la migration cellulaire de lignées cancéreuses colorectales. Plus encore, l'utilisation d'anticorps spécifiques à LRP6, ou à certaines régions spécifiques de LRP6, réduit fortement la croissance d'organoïdes *Apc*<sup>Min/+</sup> et d'organoïdes hypersensibles aux facteurs Wnt (Saito-Diaz *et al.*, 2018; Fenderico *et al.*, 2019). Somme toute, ces études suggèrent et montrent bien que LRP6 pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer colorectal.

À l'heure actuelle, il existe aussi plusieurs études cliniques testant l'efficacité de molécules inhibitrices de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Par exemple, le LGK974, un inhibiteur de la protéine porcupine, essentielle à la maturation des facteurs Wnt, démontre des résultats promoteurs dans plusieurs études cliniques de phase I. Il induit la régression tumorale de plusieurs types de cancers tels que les cancers colorectaux portant des mutations activatrices pour *BRAF*, les cancers du sein triple négatifs et les cancers pancréatiques (Raisch *et al.*, 2019). Cependant, l'utilisation d'une telle molécule, qui résulte en une inhibition totale de la sécrétion des Wnt, pourrait s'avérer toxique ou induire des effets néfastes dans plusieurs tissus de patients atteints de cancer à cause d'effets négatifs, entre autres, sur les cellules souches saines et normales. Il existe aussi des peptides bloquants de LRP6 pouvant bloquer la liaison de molécules Wnt spécifiques, sans affecter la capacité des autres Wnt à lier LRP6 et activer la signalisation en aval (Fenderico *et al.*, 2019). Cibler des régions spécifiques de la partie extracellulaire de LRP6 pourrait donc s'avérer très prometteur et beaucoup plus sécuritaire pour réduire la signalisation Wnt dépendante de la  $\beta$ -caténine sans affecter les autres fonctions des différents Wnt.

## 6. Conclusion et perspectives

En conclusion, mon projet de maîtrise n'aura malheureusement pas pu permettre d'identifier et de caractériser le(s) rôle(s) de la phosphorylation de LRP6 dans les cellules cancéreuses colorectales, notamment celles mutées pour les oncogènes *KRAS* ou *BRAF*. Même si la phosphorylation de LRP6 demeure modulable par des changements dans l'activité des kinases ERK1/2 dans ces lignées, il semble que la diminution de son expression ne soit pas suffisante pour altérer leur capacité proliférative, leur capacité de croître en indépendance d'ancrage et leur survie clonogénique.

Il y aurait quand même quelques expériences supplémentaires à mener pour vraiment confirmer que LRP6 ne contribue pas au maintien des propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales. En effet, les expériences menées lors la présente étude ont été faites avec une diminution de l'expression de LRP6 d'environ 50-70%. Tel que mentionné plus haut, il y a fort à parier que cette baisse soit insuffisante pour significativement affecter encore plus la signalisation de cellules cancéreuses fortement altérées génétiquement, surtout au niveau des gènes de la voie Wnt tels qu'*APC*, *CTTNB1*, *AXIN2*, etc. Je crois qu'il serait vraiment pertinent de refaire certaines expériences dans des cellules qui ont complètement perdu l'expression de LRP6 et de LRP5 (*knock out*) afin de s'affranchir des mécanismes compensatoires potentiels amenés par LRP5. Il serait ainsi possible d'utiliser la technologie CRISPR/Cas9 afin de générer des populations cellulaires LRP6<sup>KO</sup>/LRP5<sup>KO</sup> (Campenhout *et al.*, 2019).

Aussi, il reste important, à mon avis, d'analyser le rôle de LRP6 dans des cellules moins avancées dans le processus de carcinogénèse. En effet, notre groupe de recherche a déjà démontré que LRP6 était hyperphosphorylé non seulement dans les tumeurs avancées, mais également dans les adénomes. Ceci suggère donc que l'activation de LRP6 est impliquée précocément dans la progression tumorale colorectale, peut-être même déjà lors de l'initiation tumorale. D'ailleurs, la baisse d'expression de LRP6 dans des cellules épithéliales intestinales transformées par l'expression d'une forme constitutive active de MEK1 (MEK1SS/DD) diminue significativement leur capacité à croître en indépendance d'ancrage

(Lemieux *et al.*, 2015). Par conséquent, il serait vraiment pertinent d'étudier l'impact de la baisse d'expression de LRP6 dans un modèle plus simple de transformation cellulaire, par exemple des cellules épithéliales intestinales transformées par l'expression d'un mutant *KRAS*<sup>G12V</sup> ou *BRAF*<sup>V600E</sup> uniquement.

De plus, je crois qu'il serait aussi intéressant d'étudier plus en profondeur les mécanismes de phosphorylation de LRP6 par les kinases ERK1/2. Les questions suivantes pourraient être adressées : Est-ce que ERK1/2 phosphoryle directement LRP6? Quels résidus de LRP6 sont principalement phosphorylés par l'activation de ces kinases? Est-ce que la phosphorylation de LRP6 par les kinases ERK1/2 stimulent d'autres voies de signalisation, autre que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine? Ces différentes questions restent à mon avis très intéressantes à étudier, mais dans un modèle cellulaire dans lequel l'expression de LRP6 est importante.

En terminant, même si mes résultats n'ont pu démontrer de rôle spécifique joué par LRP6 dans les cellules cancéreuses colorectales, il demeure à mon avis (et selon les données de la littérature) très pertinent de poursuivre l'analyse de la contribution de LRP6 dans la carcinogénèse colorectale, notamment : 1- en générant des lignées cancéreuses KO pour l'expression de LRP6 et de LRP5 et 2- en testant l'impact de la perte d'expression de LRP6 (voire même aussi de LRP5) dans des modèles de transformation cellulaire moins avancée dans le processus de carcinogénèse. En effet, il demeure possible que l'expression de LRP6 soit très importante pour les premières étapes de la carcinogénèse colorectale mais que par la suite, elle devienne dispensable, en raison de l'apparition de différentes altérations génétiques affectant le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire.



## 7. Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres de mon laboratoire (anciens et présents) pour m'avoir enduré et répondu à mes mille et une questions. Sans vous et tous les fous rires, les journées auraient paru beaucoup plus longues.

Merci au Pr Steve Jean, membre de mon comité d'encadrement pour tous les conseils prodigués.

Merci aussi à mes évaluateurs Pr Simon Labbé et Pr Steve Jean d'avoir accepté de lire et de corriger mon mémoire.

J'aimerais remercier spécialement ma directrice de recherche, Nathalie pour avoir été compréhensive dans les moments les plus durs. Le fait d'avoir ce support moral a enlevé un poids tellement énorme de mes épaules... tu ne peux même pas t'imaginer!

Merci aussi à mon vieux chat, Tabby, qui m'accompagne depuis que j'ai 7 ans. Tu as toujours été là quand j'en avais besoin. Sans toi, ma petite boule d'amour <3, ça n'aurait pas été pareil.

Finalement, j'aimerais remercier tous les membres de ma famille pour m'avoir supporté pendant mes études. Merci beaucoup maman (Nancy Côté) de m'avoir donné goût à l'apprentissage. Je me rappelle encore les soirs où l'on pratiquait mes tables de multiplication jusqu'à très tard pour que ce soit parfait. Merci du fond du cœur, maman, sans toi je n'aurais jamais été aussi loin dans mon parcours scolaire.

## 8. Liste des références

- Aihara, E., Engevik, K. A., & Montrose, M. H. (2017). Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annual review of physiology*, 79, 357–380.
- Amsen, D., Antov, A., & Flavell, R. A. (2009). The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 9(2), 116-124.
- Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., & Romagnolo, B. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development*, 132(6), 1443-1451.
- Arnold, C. N., Goel, A., & Boland, C. R. (2003). Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 106(1), 66-73.
- Auclair, B. A., Benoit, Y. D., Rivard, N., Mishina, Y., & Perreault, N. (2007). Bone Morphogenetic Protein Signaling Is Essential for Terminal Differentiation of the Intestinal Secretory Cell Lineage. *Gastroenterology*, 133(3), 887-896.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells : Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 19-33.
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), 1003-1007.
- Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., Oudenaarden, A. van, & Clevers, H. (2017). Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell*, 20(2), 177-190.e4.
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK Inhibitors : Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell*, 14(2), 159-169.
- Bhagwat, S. V., McMillen, W. T., Cai, S., Zhao, B., Whitesell, M., Shen, W., Kindler, L., Flack, R. S., Wu, W., Anderson, B., Zhai, Y., Yuan, X.-J., Pogue, M., Horn, R. D. V., Rao, X., McCann, D., Dropsey, A. J., Manro, J., Walgren, J., ... Peng, S.-B. (2019). ERK Inhibitor LY3214996 Targets ERK Pathway-Driven Cancers : A Therapeutic Approach Toward Precision Medicine. *Molecular Cancer Therapeutics*.
- Biteau, B., & Jasper, H. (2011). EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 138(6), 1045-1055.
- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M. K., Tauler, J., Bikkavilli, R. K., & Winn, R. A. (2014). The Soft Agar Colony Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 92.
- Brenner, D. R., Weir, H. K., Demers, A. A., Ellison, L. F., Louzado, C., Shaw, A., Turner, D., Woods, R. R., & Smith, L. M. (2020). Projected estimates of cancer in Canada in 2020. *Canadian Medical Association Journal*, 192(9), E199-E205.
- Buechling, T., & Boutros, M. (2011). Wnt Signaling. Dans *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 97, p. 21-53). Elsevier.

- Burkhardt, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature reviews. Cancer*, 8(9), 671-682.
- Campanhout, C. V., Cabochette, P., Veillard, A.-C., Laczik, M., Zelisko-Schmidt, A., Sabatel, C., Dhainaut, M., Vanhollebeke, B., Gueydan, C., & Kruys, V. (2019). Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. *BioTechniques*, 66(6), 295-302.
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 75(1), 50-83.
- Červenka, I., Wolf, J., Mašek, J., Krejci, P., Wilcox, W. R., Kozubík, A., Schulte, G., Gutkind, J. S., & Bryja, V. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases Promote WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling via Phosphorylation of LRP6. *Molecular and Cellular Biology*, 31(1), 179-189.
- Chen, R. H., Abate, C., & Blenis, J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), 10952-10956.
- Cheng H, Leblond CP. 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* 141:461–79
- Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469-480.
- Cowan, K. J., & Storey, K. B. (2003). Mitogen-activated protein kinases : New signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology*, 206(7), 1107-1115.
- Demitrack, E. S., & Samuelson, L. C. (2016). Notch regulation of gastrointestinal stem cells. *The Journal of Physiology*, 594(17), 4791-4803.
- Engevik, Amy Christine, and James R Goldenring. "Trafficking Ion Transporters to the Apical Membrane of Polarized Intestinal Enterocytes." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 10,1 a027979. 2 Jan. 2018
- Farin, H. F., Es, J. H. V., & Clevers, H. (2012). Redundant Sources of Wnt Regulate Intestinal Stem Cells and Promote Formation of Paneth Cells. *Gastroenterology*, 143(6), 1518-1529.e7.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.
- Fenderico, N., van Scherpenzeel, R. C., Goldflam, M., Proverbio, D., Jordens, I., Kralj, T., Stryeck, S., Bass, T. Z., Hermans, G., Ullman, C., Aastrup, T., Gros, P., & Maurice, M. M. (2019). Anti-LRP5/6 VHHs promote differentiation of Wnt-hypersensitive intestinal stem cells. *Nature Communications*, 10.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., & Huelsken, J. (2007). Wnt/ $\beta$ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21), 7551-7559.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435(7044), 964-968.
- Frey, M. R., Golovin, A., & Polk, D. B. (2004). Epidermal Growth Factor-stimulated Intestinal Epithelial Cell Migration Requires Src Family Kinase-dependent p38 MAPK Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44513-44521.

- Gámez, B., Rodríguez-Carballo, E., & Ventura, F. (2013). BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7.
- González-Sancho, J. M., Aguilera, O., García, J. M., Pendás-Franco, N., Peña, C., Cal, S., de Herreros, A. G., Bonilla, F., & Muñoz, A. (2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of  $\beta$ -catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*, 24(6), 1098-1103.
- Goss, K. H., & Groden, J. (2000). Biology of the Adenomatous Polyposis Coli Tumor Suppressor. *Journal of Clinical Oncology*, 18(9), 1967-1979.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., & Clevers, H. (2005). Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *Gastroenterology*, 129(2), 626-638.
- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell Sci.* 107(Pt. 12):3569–77.
- Haramis, A.-P. G., Begthel, H., Born, M. van den, Es, J. van, Jonkheer, S., Offerhaus, G. J. A., & Clevers, H. (2004). De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine. *Science*, 303(5664), 1684-1686.
- Hardwick, J. C. H., Brink, G. R. V. D., Bleuming, S. A., Ballester, I., Brande, J. M. H. V. D., Keller, J. J., Offerhaus, G. J. A., Deventer, S. J. H. V., & Peppelenbosch, M. P. (2004). Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology*, 126(1), 111-121.
- Horiguchi, H., Endo, M., Kawane, K., Kadomatsu, T., Terada, K., Morinaga, J., Araki, K., Miyata, K., & Oike, Y. (2017). ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. *The EMBO Journal*, 36(4), 409-424.
- Hu, Y.-H., Chen, Q., Lu, Y.-X., Zhang, J.-M., Lin, C., Zhang, F., Zhang, W.-J., Li, X.-M., Zhang, W., & Li, X.-N. (2017). Hypermethylation of NDN promotes cell proliferation by activating the Wnt signaling pathway in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(28), 46191-46203.
- Khalaj, A., Doroudi, A. R., Ostad, S. N., Khoshayand, M. R., Babai, M., & Adibpour, N. (2006). Synthesis, aerobic cytotoxicity, and radiosensitizing activity of novel 2,4-dinitrophenylamine tethered 5-fluorouracil and hydroxyurea. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(23), 6034-6038.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., & Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), 417-421.
- Ji, Q., Cai, G., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, L., Sui, H., & Li, Q. (2019). MALAT1 regulates the transcriptional and translational levels of proto-oncogene RUNX2 in colorectal cancer metastasis. *Cell Death & Disease*, 10(6).
- Johansson, Malin E V, and Gunnar C Hansson. "Immunological aspects of intestinal mucus and mucins." *Nature reviews. Immunology* vol. 16,10 (2016): 639-49.
- Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer causes & control : CCC*, 24(6), 1207-1222.
- Karoui, M., Tresallet, C., Brouquet, A., Radvanyi, H., & Penna, C. (2007). Carcinogènese colorectale. *Journal de Chirurgie*, 144(1), 13-18.
- Koch, S. (2017). Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine. *Differentiation*, 97, 1-8.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75.

- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., & Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genetics*, 19(4), 379-383.
- Kosinski, C., Li, V. S. W., Chan, A. S. Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W. Y., Chan, T. L., Mifflin, R. C., Powell, D. W., Yuen, S. T., Leung, S. Y., & Chen, X. (2007). Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15418-15423.
- Krejci, P., Aklian, A., Kaucka, M., Sevcikova, E., Prochazkova, J., Masek, J. K., Mikolka, P., Pospisilova, T., Spoustova, T., Weis, M., Paznekas, W. A., Wolf, J. H., Gutkind, J. S., Wilcox, W. R., Kozubik, A., Jabs, E. W., Bryja, V., Salazar, L., Vesela, I., & Balek, L. (2012). Receptor Tyrosine Kinases Activate Canonical WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling via MAP Kinase/LRP6 Pathway and Direct  $\beta$ -Catenin Phosphorylation. *PLOS ONE*, 7(4), e35826.
- Lambin, P., Malaise, E. P., & Joiner, M. C. (1996). Might intrinsic radioresistance of human tumour cells be induced by radiation? *International Journal of Radiation Biology*, 69(3), 279-290.
- Lemieux, É., Bergeron, S., Durand, V., Asselin, C., Saucier, C., & Rivard, N. (2009). Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *International Journal of Cancer*, 125(7), 1575-1586.
- Lemieux, E., Cagnol, S., Beaudry, K., Carrier, J., & Rivard, N. (2015). Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene*, 34(38), 4914-4927.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649.
- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., & Baltimore, D. (2004). Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell*, 119(1), 97-108.
- Lu, X., Borchers, A. G. M., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Baker, J. C., & Tessier-Lavigne, M. (2004). PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*, 430(6995), 93-98.
- MacDonald, B. T., & He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12).
- Magudia, K., Lahoz, A., & Hall, A. (2012). K-Ras and B-Raf oncogenes inhibit colon epithelial polarity establishment through up-regulation of c-myc. *The Journal of Cell Biology*, 198(2), 185-194.
- Makrodouli, E., Oikonomou, E., Koc, M., Andera, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., & Pintzas, A. (2011). BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells : A comparative study. *Molecular Cancer*, 10(1), 118.
- Marchbank, T., Goodlad, R. A., Lee, C. Y., & Playford, R. J. (1995). Luminal Epidermal Growth Factor is Trophic to the Small Intestine of Parenterally Fed Rats. *Clinical Science*, 89(2), 117-120.
- Marieb E. N. and Hoehn, K (2012). *Anatomy & Physiology*. Boston: Pearson (9<sup>th</sup> ed., 1<sup>st</sup> ed. 1989).
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., & Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263-1284.

- Midthun, L., Shaheen, S., Deisch, J., Senthil, M., Tsai, J., & Hsueh, C.-T. (2019). Concomitant KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 10(3), 577-581.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., & Clevers, H. (1996). XTcf-3 Transcription Factor Mediates  $\beta$ -Catenin-Induced Axis Formation in *Xenopus* Embryos. *Cell*, 86(3), 391-399.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A., & Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes & Development*, 13(9), 1181-1189.
- Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., Long, B., Liu, J., DiNunzio, E., Windsor, W., Zhang, R., Zhao, S., Angagaw, M. H., Pinheiro, E. M., Desai, J., ... Samatar, A. A. (2013). Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors. *Cancer Discovery*, 3(7), 742-750.
- Mundade, R., Imperiale, T. F., Prabhu, L., Loehrer, P. J., & Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400-406.
- Niehrs, C., & Shen, J. (2010). Regulation of Lrp6 phosphorylation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(15), 2551-2562.
- Nishita, M., Yoo, S. K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., & Minami, Y. (2006). Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *The Journal of Cell Biology*, 175(4), 555-562.
- Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., & Pouyssegur, J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(18), 8319-8323.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., & Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & Development*, 17(14), 1709-1713.
- Porru, M., Pompili, L., Caruso, C., Biroccio, A., & Leonetti, C. (2018). Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer : Current strategies and emerging opportunities. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 37.
- Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., Li, B., Han, J.-D. J., & Chen, Y.-G. (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5 + stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nature Communications*, 8(1), 1-14.
- Reddi, A. H. (2005). BMPs : From bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(3), 249-250.
- Rismani, E., Fazeli, M. S., Mahmoodzadeh, H., Movassagh, A., Azami, S., Karimipoor, M., & Teimoori-Toolabi, L. (2017). Pattern of LRP6 gene expression in tumoral tissues of colorectal cancer. *Cancer Biomarkers*, 19(2), 151-159.
- Saito-Diaz, K., Benchabane, H., Tiwari, A., Tian, A., Li, B., Thompson, J. J., Hyde, A. S., Sawyer, L. M., Jodoin, J. N., Santos, E., Lee, L. A., Coffey, R. J., Beauchamp, R. D., Williams, C. S., Kenworthy, A. K., Robbins, D. J., Ahmed, Y., & Lee, E. (2018). APC Inhibits Ligand-Independent Wnt Signaling by the Clathrin Endocytic Pathway. *Developmental Cell*, 44(5), 566-581.e8.
- Sasai, N., Nakazawa, Y., Haraguchi, T., & Sasai, Y. (2004). The neurotrophin-receptor-related protein NRH1 is essential for convergent extension movements. *Nature Cell Biology*, 6(8), 741-748.

- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415-418.
- Schatoff, E. M., Leach, B. I., & Dow, L. E. (2017). Wnt Signaling and Colorectal Cancer. *Current colorectal cancer reports*, 13(2), 101-110.
- Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Becelaere, K. V., Wiland, A., Gowan, R. C., Teele, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W. R., & Saltiel, A. R. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Medicine*, 5(7), 810-816.
- Schneider, C., O'Leary, C. E., & Locksley, R. M. (2019). Regulation of immune responses by tuft cells. *Nature Reviews Immunology*, 19(9), 584-593.
- Sneddon, J. B., Zhen, H. H., Montgomery, K., Rijn, M. van de, Tward, A. D., West, R., Gladstone, H., Chang, H. Y., Morganroth, G. S., Oro, A. E., & Brown, P. O. (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(40), 14842-14847.
- Specian, R D, and M G Oliver. "Functional biology of intestinal goblet cells." *The American journal of physiology* vol. 260,2 Pt 1 (1991): C183-93.
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., ... Forbes, S. A. (2019). COSMIC : The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D941-D947.
- Tan, X., & Wang, J. Y. J. (1998). The caspase-RB connection in cell death. *Trends in Cell Biology*, 8(3), 116-120.
- Tie, J., Gibbs, P., Lipton, L., Christie, M., Jorissen, R. N., Burgess, A. W., Croxford, M., Jones, I., Langland, R., Kosmider, S., McKay, D., Bollag, G., Nolop, K., Sieber, O. M., & Desai, J. (2011). Optimizing targeted therapeutic development: Analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAFV600E mutation. *International Journal of Cancer*, 128(9), 2075-2084.
- Troiani, T., Napolitano, S., Vitagliano, D., Morgillo, F., Capasso, A., Sforza, V., Nappi, A., Ciardiello, D., Ciardiello, F., & Martinelli, E. (2014). Primary and Acquired Resistance of Colorectal Cancer Cells to Anti-EGFR Antibodies Converge on MEK/ERK Pathway Activation and Can Be Overcome by Combined MEK/EGFR Inhibition. *Clinical Cancer Research*, 20(14), 3775-3786.
- Van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241–260.
- VanDussen, K. L., Carulli, A. J., Keeley, T. M., Patel, S. R., Puthoff, B. J., Magness, S. T., Tran, I. T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, Å., Grosse, A. S., Gumucio, D. L., Ernst, S. A., Tsai, Y.-H., Dempsey, P. J., & Samuelson, L. C. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development*, 139(3), 488-497.
- Vatansever, S., Erman, B., & Gümüş, Z. H. (2019). Oncogenic G12D mutation alters local conformations and dynamics of K-Ras. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.
- von Moltke, J., Ji, M., Liang, H. E., & Locksley, R. M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, 529(7585), 221–225.
- von Moltke, J. (2018). Intestinal Tuft Cells. *Dans Physiology of the Gastrointestinal Tract* (p. 721-733). Elsevier.

- Wan, M., Yang, C., Li, J., Wu, X., Yuan, H., Ma, H., He, X., Nie, S., Chang, C., & Cao, X. (2008). Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes & Development*, 22(21), 2968-2979.
- Wendel, H.-G., Silva, R. L. A., Malina, A., Mills, J. R., Zhu, H., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Teruya-Feldstein, J., Pelletier, J., & Lowe, S. W. (2007). Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes & Development*, 21(24), 3232-3237.
- Xing, J., Ginty, D. D., & Greenberg, M. E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5277), 959-963.
- Yao, Q., An, Y., Hou, W., Cao, Y.-N., Yao, M.-F., Ma, N.-N., Hou, L., Zhang, H., Liu, H.-J., & Zhang, B. (2017). LRP6 promotes invasion and metastasis of colorectal cancer through cytoskeleton dynamics. *Oncotarget*, 8(65), 109632-109645.
- Zhong, Z., Baker, J. J., Zylstra-Diegel, C. R., & Williams, B. O. (2012). Lrp5 and Lrp6 play compensatory roles in mouse intestinal development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 31-38.
- Zhou, G., Yang, J., & Song, P. (2019). Correlation of ERK/MAPK signaling pathway with proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *Oncology Letters*, 17(2), 2266-2270.